

Studien zur Beladungskapazität kolloidaler Formulierungen



seit 1558

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

„doctor rerum naturalium“ (Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät

der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Apotheker Dipl. Pharm. Stephan Holzschuh

geboren am 24.12.1986 in Erfurt

Gutachter:

- | | |
|--------------------------------------|--|
| 1. Prof. em. Dr. Alfred Fahr | Friedrich-Schiller-Universität Jena |
| 2. Prof. Dr. Judith Kuntsche | Syddansk Universitet Odense, Dänemark |
| 3. Prof. em. Dr. Gerrit L. Scherphof | Rijksuniversiteit Groningen, Niederlande |

Tag der öffentlichen Verteidigung:

11. November 2016

Für Anita und meine Familie

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Herrn Prof. Alfred Fahr angefertigt. Ihm gebührt mein aufrichtiger Dank für die akademische, finanzielle und universitätspolitische Unterstützung, das gezeigte Vertrauen, die gewährten wissenschaftlichen Freiheiten sowie die gebotenen Möglichkeiten der Weiterbildung im In- und Ausland.

Frau Prof. Judith Kuntsche von der Syddansk Universitet in Odense, Dänemark danke ich für die aufschlussreichen wissenschaftlichen Diskussionen in den vergangenen Jahren sowie den Forschungsaufenthalt in Odense. Herrn Prof. Sylvio May und Guilherme Volpe Bossa von der North Dakota State University, USA danke ich für die mathematisch-physikalische Unterstützung bei den theoretischen Betrachtungen der erhobenen Daten.

Ferner möchte ich mich bei meinen Damen aus der „Plasmagruppe“ – Frau Dr. Christiane Decker und Frau Kathrin Kaeß – für die hervorragende Kommunikation, die vielen Anregungen und die geleistete Unterstützung bei den Versuchen, der anschließenden Dateninterpretation und -veröffentlichung bedanken. In diesem Zusammenhang sei auch dem Phospholipid Research Center für die finanzielle Unterstützung unseres Projektes und Herrn Prof. Ulrich S. Schubert sowie seinem Arbeitskreis – im Speziellen meinen AF4-Mitstreitern Dr. Esra Altuntaş und Dr. Michael Wagner – für die Möglichkeit gedankt, diese Untersuchungen durchzuführen.

Ein besonderer Dank gilt meinen Bürokollegen Dr. Ronny Rüger und Markus Rabenhold für die höchst relevanten Diskussionen theoretischer und praktischer, wissenschaftlicher, aber auch alltäglicher Art, ihre Hilfsbereitschaft und die gemeinsamen Stunden abseits der Arbeit. Gleichzeitig möchte ich mich bei ehemaligen Kolleginnen und Kollegen am Lehrstuhl für pharmazeutische Technologie für die angenehme Arbeitsatmosphäre, die geleistete Unterstützung und die vielen schönen Momente innerhalb und außerhalb des Instituts danken. Yvette Pötzing danke ich zusätzlich insbesondere für die gemeinsamen und unterhaltsamen Praktika und Zugfahrten, ihr allzeit kritisches Auge und ihre offenen Ohren für Probleme aller Art.

Es sei aber auch meinen Freunden, derzeitigen Kollegen und allen weiteren Personen gedankt, die mich in den letzten Jahren unterstützt haben und mich in den letzten Monaten nahezu täglich daran erinnerten, welche Aufgaben mich daheim noch erwarten, um diese Arbeit in einer angemessenen Zeit abzuschließen.

Es tut mir aufrichtig leid, wenn ich an dieser Stelle jemanden vergessen habe, der sich einen Platz hier verdient hat. Aber mein letzter Dank gilt meiner Familie und Anita. Eure grenzenlose Unterstützung in den vergangenen Jahren bzw. Jahrzehnten hat maßgeblich dazu beigetragen, dass ich diesen Weg gegangen bin und (hoffentlich) erfolgreich gemeistert habe.

***„So eine Arbeit wird eigentlich nie fertig,
man muß sie für fertig erklären,
wenn man nach Zeit und Umständen das möglichste getan hat.“***

(Johann Wolfgang von Goethe)

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	V
Abkürzungen	VI
1 Einleitung	1
1.1 Schwerlösliche Arzneistoffe	1
1.2 Liposomen	2
1.2.1 Definition	2
1.2.2 Liposomen als Trägersysteme in der Pharmazie	4
1.2.3 Grundlagen des <i>in vivo</i> Verhaltens von Liposomen	6
1.2.4 Möglichkeiten der Modifikation der Formulierung	8
1.3 Temoporfin	14
1.3.1 Photodynamische Therapie (PDT)	15
1.3.2 Physikochemische Eigenschaften	16
1.3.3 Pharmakokinetische Untersuchungen	16
1.4 <i>In vitro</i> -Modelle zur Abschätzung der <i>in vivo</i> -Pharmakokinetik liposomaler Formulierungen	17
1.4.1 Membranaffinität	18
1.4.2 Transfer zwischen Modellmembranen	18
1.4.3 Transfer an endogene Membranen	19
1.4.4 Asymmetrische Fluss Feld-Fluss Fraktionierung	21
1.4.5 Langmuir-Filmwaage	24
1.5 Problem- und Zielstellung der Arbeit	26
2 Veröffentlichungen	28
2.1 Übersicht zu den Veröffentlichungen	28
2.1.1 Veröffentlichung 1	28
2.1.2 Veröffentlichung 2	29
2.1.3 Veröffentlichung 3	30
2.2 Veröffentlichung 1	31
2.3 Veröffentlichung 2	58
2.4 Veröffentlichung 3	91

3	Unveröffentlichte Daten	136
3.1	Motivation	136
3.2	Materialien und Methoden	136
3.2.1	Chemikalien	136
3.2.2	Herstellung der Liposomen	137
3.2.3	Gehaltsbestimmung	137
3.2.4	Flüssigszintillationszählung	138
3.2.5	Photonenkorrelationsspektroskopie	139
3.2.6	Weiterführende Untersuchungen an der AF4	139
3.3	Ergebnisse und Diskussion der weitergehenden Untersuchungen des Verhaltens lipophiler liposomaler APIs in humanem Plasma	142
3.3.1	Charakterisierung der Formulierungen	142
3.3.2	Transferuntersuchungen in humanem Plasma	144
3.4	Ergebnisse und Diskussion der Untersuchungen an der Langmuir-Filmwaage	145
3.4.1	Einfluss von mTHPC auf die Eigenschaften von PC-Monoschichten	146
3.4.2	Transferverhalten lipophiler Modellsubstanzen an Monoschichten	149
4	Abschlussdiskussion	157
4.1	<i>In vitro</i> -Untersuchungen zum Verhalten liposomaler Formulierungen in humanem Plasma	158
4.2	<i>In vitro</i> -Verhalten von mTHPC-Liposomen in Plasma	163
4.2.1	Einbau von mTHPC in den Bilayer	163
4.2.2	Einfluss der Formulierung auf die <i>in vitro</i> -Stabilität und Wirkstofffreisetzung	165
4.2.3	Zusammenfassung	169
4.3	Ausblick	171
5	Zusammenfassung	173
6	Summary	175
	Literaturverzeichnis	177
	Selbständigkeitserklärung	193

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Chemisches Grundgerüst eines Phosphoglycerids und Sphingolipids sowie eine schematische Darstellung des Querschnitts eines unilamellaren Liposom.....	3
Abbildung 2:	Möglichkeiten der Modifikationen der Formulierung, die einen Einfluss auf das <i>in vivo</i> -Verhalten der Liposomen haben können.	9
Abbildung 3:	Prinzip der photodynamischen Therapie und der möglichen Reaktionstypen. In beiden Fällen kommt es zur Ausbildung oxidativer Produkte, die im Folgenden das Gewebe direkt zerstören können, das Tumorgefäßsystem schädigen oder eine Immunreaktion gegen die Tumorzellen hervorrufen. Modifiziert nach Dolmans et al. (Dolmans et al. 2003).	15
Abbildung 4:	Chemische Struktur von mTHPC.	16
Abbildung 5:	Mögliche Transfermechanismen eines lipophilen Wirkstoffes aus Liposomen in humanem Plasma. Plasmaproteine (stellvertretend ist Albumin dargestellt) und Lipoproteine stellen mögliche Akzeptoren dar.....	20
Abbildung 6:	Schematischer Querschnitt durch einen AF4-Kanal, der das Trennprinzip verdeutlicht. Nach der Elution kann eine Detektion über verschiedene Detektorsysteme erfolgen.....	22
Abbildung 7:	Schematischer Aufbau einer Langmuir-Filmwaage, in der ein Phospholipid-Monolayer auf einer wässrigen Phase aufgetragen wurde. Über bewegliche Barrieren lässt sich der Film komprimieren oder expandieren. Die Messung der Oberflächenspannung erfolgt mithilfe einer Wilhelmy-Waage (z.B. Filterpapier).	24
Abbildung 8:	Beispiel einer π -A-Isotherme eines Phospholipidmonolayers sowie die einzelnen Zustände / Phasen, die er während der Kompression besitzen kann. Auf der rechten Seite ist die Packung der Lipide in den einzelnen Phasen schematisch dargestellt. Abbildung modifiziert nach Moghaddam et al. (Moghaddam et al. 2011).....	25
Abbildung 9:	Isothermen für (A) reine DPPC-, POPC- und mTHPC-Filme, (B) DPPC / mTHPC-Gemische und (C) POPC / mTHPC-Gemische in jeweils unterschiedlichen molaren Verhältnissen von 1:0 bis 0:1. Gereinigtes Wasser stellte die Subphase dar. Die dazugehörigen Daten sind in Tabelle 5 dargestellt.	146

- Abbildung 10:** Transferverhalten von Curcumin aus DPPC/DPPG-Liposomen (9:1 (m/m)) an einen POPC-Film bei $\pi = 25$ mN/m. Dargestellt ist der Einfluss des Liposomen/POPC-Verhältnisses. Der Film enthielt ca. 6×10^{-9} mol POPC. Die Kurven entsprechen dem relativen Flächenzuwachs der Monoschicht über die Zeit nach Zugabe unterschiedlicher Stoffmengen an liposomalen Lipid in die Subphase. Dargestellt sind die entsprechenden Mittelwerte für jeweils mindestens drei unabhängige Experimente. Die Kurven wurden mithilfe einer einfachen exponentiellen Funktion extrapoliert. Die dazugehörigen Daten befinden sich in Tabelle 7A ($n \geq 3$). 151
- Abbildung 11:** Maximaler relativer Flächenzuwachs eines POPC-Monolayers bei verschiedenen π nach Zugabe konstanter Mengen an DPPC/DPPG-Liposomen (9:1 (m/m)) mit einer Beladung von 8 mol% Curcumin in die Subphase. Die Daten entsprechen dem Mittelwert aus mindestens drei unabhängig durchgeführten Experimenten. Die dazugehörigen Daten befinden sich in Tabelle 7C. 152

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Übersicht über liposomale Marktprodukte und deren Zusammensetzung (Auszug). Modifiziert nach Allen und Cullis, ergänzt durch Daten aus PharmaCircle (Allen und Cullis 2013, PharmaCircle LLC 2016).	5
Tabelle 2:	Bestimmung der Einschlusseffizienz (EE) mittels HPLC. (I) Methode und (II) die entsprechenden Detektionswellenlängen.	138
Tabelle 3:	Auftrennung des Plasma-Liposomen-Gemisches mittels AF4.	139
Tabelle 4:	Zusammensetzung, Partikelgröße und Partikelgrößenverteilung (PDI) der untersuchten Formulierungen sowie die Einschlusseffizienz (EE) der jeweiligen Arzneistoffe in den Bilayer und die Wiederfindungen (WF) nach Auftrennung mithilfe der AF4. Die Formulierungen wurden in 5 %iger (m/V) Glukoselösung hergestellt.	142
Tabelle 5:	Kollapsdrücke und Flächen pro Molekül für die aufgenommen Langmuir-Isothermen verschieden zusammengesetzter Monoschichten. Flächen pro Molekül wurden durch Extrapolation der linearen Teile der Isothermen berechnet. ΔA_{Diff} gibt die berechnete Abweichung vom theoretischen Wert an, der sich aus der prozentualen Zusammensetzung und den jeweiligen Einzelflächen der Komponenten ergibt.	147
Tabelle 6:	Zusammensetzung, Partikelgröße und Partikelgrößenverteilung (PDI) der am Langmuir-Trog untersuchten Formulierungen sowie die Einschlusseffizienz (EE) der jeweiligen Arzneistoffe in den Bilayer. Die Liposomen wurden in Reinstwasser hergestellt.	150
Tabelle 7:	Transfereigenschaften verschiedener Substanzen aus liposomalen Doppelschichten an eine POPC-Monoschicht. Dabei wurde der Einfluss des (A) Donor-Akzeptor-Verhältnisses, (B) der Lipidzusammensetzung und Beladung der liposomalen Formulierung mit Curcumin als Modellsubstanz und (C) der Oberflächenspannung der Monoschicht untersucht. Zusätzlich wurde (D) das Transferverhalten für verschiedene lipophile Modellsubstanzen aus DPPC/DPPG Liposomen bestimmt. Die Subphase, in welche die Liposomen injiziert wurden, bestand dabei aus gereinigtem Wasser und wurde kontinuierlich gerührt. Der Monolayer bestand aus ca. $6 \cdot 10^{-9}$ mol POPC.	154

Abkürzungen

A	Fläche
ABC	Beschleunigte Clearance aus dem Blut (accelerated blood clearance)
AF4	Asymmetrische Feld Fluss-Feld Fraktionierung (asymmetric flow field-flow fractionation)
API	Arzneistoff (active pharmaceutical ingredient)
BCS	Biopharmazeutisches Klassifizierungssystem (biopharmaceutical classification system)
ca.	zirka
Ca ²⁺	Calcium-Ionen
CARPA	Komplement-aktivierte Pseudoallergie (C-activation related pseudoallergy)
CETP	Cholesterolester-Transferprotein
COE	Cholesterylölether
CRS	Chemische Referenzsubstanz
DAD	Diodenarray-Detektor
DLS	Dynamische Lichtstreuung (dynamic light scattering)
DSC	Dynamische Differenzkalorimetrie (differential scanning calorimetry)
EE	Einschlusseffizienz
ESR	Elektronenspinresonanz (electron paramagnetic resonance = EPR)
FDA	Behörde für Lebens- und Arzneimittel der USA (Food and Drug Administration)
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
ggf.	gegebenenfalls
GPC	Gelpermeationschromatographie
HDL	High-Density-Lipoprotein
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (high performance liquid chromatography)
IAM	immobilisierte artifizielle Membranen (immobilized artificial membranes)
LCAT	Lecithin-Cholesterol-Acyltransferase

Abkürzungen

LDL	Low-Density-Lipoprotein
LEKC	Liposomen-elektrokinetische Chromatographie (liposome electrokinetic chromatography)
LSC	Flüssigszintillationszählung (liquid scintillation counting)
LUV	große unilamellare Vesikel (large unilamellar vesicles)
MLV	multilamellare Vesikel (multilamellar vesicles)
Mn ²⁺	Mangan-Ionen
MPS	Mononukleäres Phagozytensystem
mTHPC	Temoporfin (Meso-tetrahydroxyphenylchlorin)
NCE	neue chemische Substanz (New Chemical Entity)
NTA	Nanotracking Analysis
o.g.	oben genannt(e)
OLV	oligolamellare Vesikel (oligolamellar vesicles)
PDI	Polydispersitätsindex
PEG	Polyethylenglykol
PLTP	Phospholipid-Transferprotein
PDT	Photodynamische Therapie
RI	Brechungsindex (Refractive Index)
rpm	Umdrehungen pro Minute (revolutions per minute)
SEC	Größenausschlusschromatographie (Size-Exclusion Chromatography)
SUV	kleine unilamellare Vesikel (small unilamellar vesicles)
UV/Vis	ultraviolette und sichtbares Licht
Vgl.	vergleiche
WF	Wiederfindung
z.B.	zum Beispiel

Formelzeichen

ΔA [%]	Flächenänderung in Prozent
ΔA_{Diff} [%]	Abweichung der Flächenänderung vom berechneten Wert
A	Fläche
d	Durchmesser
π	Lateraldruck
n	Anzahl
$t_{0,5}$	Halbwertszeit

Lipide

DEPC	1,2-Dierucoyl-sn-glycero-3-phosphocholin
DMPC	1,2-Dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholin
DMPG	1,2-Dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphoglycerol (Natriumsalz)
DOPC	1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholin
DOPG	1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoglycerol (Natriumsalz)
DPPC	1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholin
DPPG	1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoglycerol (Natriumsalz)
DOTAP	1,2-Dioleoyl-3-trimethylammonium-propan (Chloridsalz)
DSPC	1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholin
DSPE	1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin
DSPE-PEG ₇₅₀	1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin-N-[amino(polyethylenglycol)-750] (Ammoniumsalz)
DSPE-PEG ₂₀₀₀	1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin-N-[amino(polyethylenglycol)-2000] (Ammoniumsalz)
DSPG	1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphoglycerol (Natriumsalz)
EPC	Ei-Phosphatidylcholin
EPG	Ei-Phosphatidylglycerol
HSPC	Hydriertes Soja-Phosphatidylcholin
POPC	1-Palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholin
POPG	1-Palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphoglycerol
SPC	Soja-Phosphatidylcholin

1 Einleitung

1.1 Schwerlösliche Arzneistoffe

Die Entwicklung neuer Medikamente ist zeitaufwendig und kostenintensiv. Moderne Methoden der Wirkstoffentwicklung – wie z.B. High-Throughput-Screening, Struktur-Wirkungs-Analyse oder virtuelle Modellierung – stellen eine Möglichkeit dar, diesen Prozess in der frühen Entwicklungsphase zu optimieren. Die resultierenden Substanzen zeigen anschließend in *in vitro* Modellen häufig eine überlegene Pharmakodynamik.

Allerdings weist ein großer Teil dieser Wirkstoffe problematische physikochemische Eigenschaften – z.B. eine eingeschränkte Löslichkeit – auf, die den Formulierungsentwickler vor eine Herausforderung stellen. In der Literatur wird berichtet, dass 40 % der zugelassenen Wirkstoffe und 90 % der chemischen Entwicklungskandidaten schwer löslich sind und den Klassen II und IV des Biopharmazeutischen Klassifizierungssystems (BCS) zugeordnet werden müssen (Amidon et al. 1995, Dahan et al. 2009, Loftsson und Brewster 2010).

Im Falle einer oralen Darreichungsform stellt die Löslichkeit des Wirkstoffs neben dem Permeationsvermögen den wichtigsten Faktor für die Absorption im Gastrointestinaltrakt dar. Aus diesem Grund spielen die Optimierung der Auflösungsgeschwindigkeit und Löslichkeit in der Formulierungsentwicklung eine entscheidende Rolle. Hierfür stehen verschiedene Technologien – z.B. Reduktion der Partikelgröße oder Tabletten mit modifizierter Wirkstofffreisetzung – zur Verfügung (Rao et al. 2001, Savjani et al. 2012).

Sollten diese Optionen nicht zum gewünschten Erfolg führen, besteht für manche APIs (Active Pharmaceutical Ingredients) zusätzlich noch die Möglichkeit, sie parenteral zu applizieren. Durch die Umgehung der gastrointestinalen Resorption können hierdurch – bei gleicher Dosierung – höhere Plasmaspiegel erzielt werden. Andere Vorteile sind z.B. eine patientenindividuelle Dosierung oder die Möglichkeit zur Behandlung von Personen, die aus verschiedenen Gründen keine orale Therapie erhalten können (Bewusstlosigkeit, Übelkeit, u.a.). Dem gegenüber stehen erhöhte Anforderungen an das Produkt (Mikrobiologie, Partikelfreiheit, u.a.) und das medizinische Personal. Durch die direkte Applikation in den Kreislauf existieren weiterhin vermehrte Risiken für den Patienten, beispielsweise Sepsis oder Embolien (Ochoa und Vega 2014).

Durch Verwendung parenteraler Arzneistoffträgersysteme entstehen weitere Vorteile: Neben einer häufig erhöhten Löslichkeit des Wirkstoffes, können diese Formulierungen auch dazu genutzt werden, den Wirkstoff aktiv oder passiv an den gewünschten Wirkort zu transportieren (Fahr und Liu 2007). Diese Systeme stehen im Einklang mit den von Paul Ehrlich postulierten

„Magic Bullets“ – Wirkstoffe bzw. Therapien, die ihre Wirkung lediglich am gewünschten Ziel entfalten und dadurch Nebenwirkungen verringern (Strebhardt und Ullrich 2008).

In der Literatur werden verschiedene Ansätze beschrieben, eine solche „eierlegende Wollmilchsau der Pharmazie“ zu entwickeln. Liposomen stellen dabei ein mögliches Trägersystem dar, dass in der Praxis in verschiedenen – von den Gesundheitsbehörden zugelassenen – Präparaten bereits erfolgreich Anwendung findet (Vergleiche Tabelle 1).

1.2 Liposomen

1.2.1 Definition

1964 beschrieb der britische Biophysiker Alec D. Bangham in Zusammenarbeit mit Robert W. Horne erstmals multilamellare Vesikelstrukturen, die durch Lecithin gebildet und mit einem Elektronenmikroskop untersucht wurden (Bangham und Horne 1964). Mit den darauf folgenden Erkenntnissen, dass der sich bildende Bilayer in der Lage war, eine verkapselte hydrophile Phase von seiner externen Umgebung zu isolieren (Bangham et al. 1965a), und in seiner Eigenschaft durch Tenside gestört werden kann (Bangham et al. 1965b), unterstützte er die Hypothese, dass Lipide die Grundlage von zellulären Membranen bilden. Aus diesem Grund wurden Liposomen – wie sie später genannt wurden – in folgenden Studien gerne als Modellmembranen verwendet (Deamer 2010).

Unter Liposomen versteht man heute kugelförmige Vesikel im Bereich von 25 nm bis zu mehreren Mikrometern. Ihre Grundbausteine sind amphiphile Moleküle, – z.B. Phosphoglyceride oder Sphingolipide – die aus einer hydrophilen / polaren Kopfgruppe und einem lipophilen Molekülrest bestehen (van Hoogevest et al. 2013). In Wasser lagern sich diese Moleküle aufgrund des hydrophoben Effektes zusammen und bilden ab einer gewissen Konzentration eine Membran – den sogenannten Bilayer – aus (Tanford 1978). Dieser wiederum bildet aus energetischen und sterischen Gründen ein- oder mehrschichtige (uni- oder multilamellare) Assoziationskolloide, die eine oder mehrere hydrophile Phasen einschließen. Jede Schicht entspricht dabei einem Bilayer (New 1990). Diese Phasen sind nicht in der Lage, die sie umgebende Membran zu passieren. Durch diesen Aufbau ist es möglich, lipophile Substanzen in den Bilayer einzubauen oder hydrophile Substanzen in der wässrigen Phase zu verkapseln (Bangham et al. 1965a, van Hoogevest et al. 2013).

Die Herstellungsart hat dabei einen entscheidenden Einfluss auf die Morphologie der entstehenden Liposomen. Je nach Vesikelgröße und Anzahl der Bilayer unterscheidet man u.a. zwischen (Kreuter 1994, Sharma und Sharma 1997):

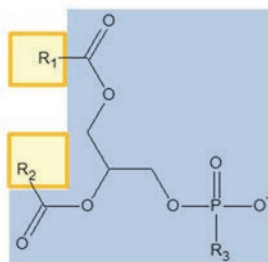
- **MLV:** Multilamellar Vesicle (> 0,5 µm) (> 5 Lipidschichten)
- **OLV:** Oligolamellar Vesicle (> 0,5 µm) (2-5 Lipidschichten)
- **GUV:** Giant Unilamellar Vesicle (> 1 µm) (1 Lipidschicht)
- **LUV:** Large Unilamellar Vesicle (> 100 nm) (1 Lipidschicht)
- **SUV:** Small Unilamellar Vesicle (20-100 nm) (1 Lipidschicht)

SUVs werden aus LUVs durch Energieeintrag während der Herstellung (z.B. Extrusion oder Microfluidizer) gewonnen und zeigen eine erhöhte Krümmung des Bilayers. Sie sind dadurch thermodynamisch instabiler als LUVs, die aufgrund ihrer Größe ähnlich zu planaren Membranen keine wesentliche Krümmung aufweisen, und neigen unterhalb der Phasenübergangstemperatur zu Aggregation und Fusion. Durch ihre geringe Partikelgröße und enge Partikelgrößenverteilung werden sie dennoch in der Anwendung bevorzugt (New 1990, Sharma und Sharma 1997). GUVs finden vor allem in der Grundlagenforschung als Zellmodelle Anwendung (Chan und Boxer 2007).

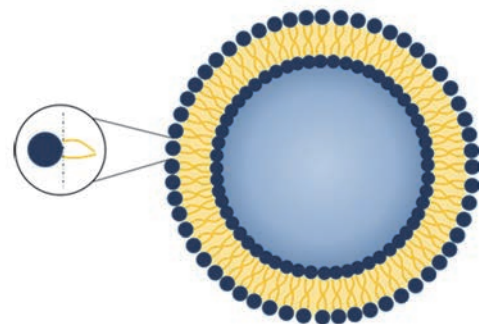
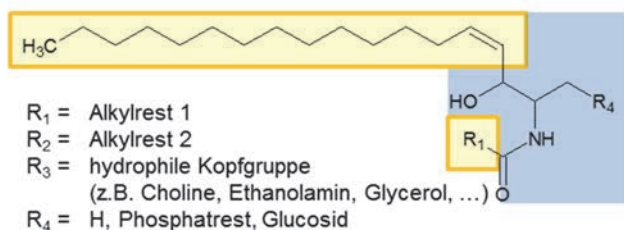
Ein schematischer Querschnitt eines unilamellaren Liposoms sowie das chemische Grundgerüst der entsprechenden Lipide sind in Abbildung 1 dargestellt.

Phospholipide

(I) Phosphoglyceride



(II) Sphingolipide



hydrophil
lipophil

Abbildung 1: Chemisches Grundgerüst eines Phosphoglycerids und Sphingolipids sowie eine schematische Darstellung des Querschnitts eines unilamellaren Liposoms.

Das hier dargestellte Phosphoglycerid besteht aus einem Glycerolgrundgerüst, das am C₃-Atom mit einem Phosphatrest und am C₁- und C₂-Atom mit jeweils einer Fettsäure verestert wird. Ist nur eines der beiden Atome mit einer Fettsäure verestert, während das andere als Alkohol vorliegt, spricht man von einem Lysolipid. Die Fettsäure sowie der Phosphatrest spielen dabei eine große Rolle für die Eigenschaften des Phospholipids und damit auch auf die des Bilayers (Vergleiche 1.2.4.1).

Das Grundgerüst der Sphingolipide bildet der ungesättigte Aminoalkohol Sphingosin, an dem über eine Amidbindung eine Fettsäure verbunden wird. Wird die hydrophile Kopfgruppe über einen Phosphatrest gekoppelt, spricht man von Sphingomyelinen. Des Weiteren unterscheidet man Ceramide (R₄ = H) und Glycosphingolipide. Sphingolipide und Phospholipide sind auch Bestandteil von Zellmembranen (Berg 2002).

1.2.2 Liposomen als Trägersysteme in der Pharmazie

Aufgrund ihrer Fähigkeit, sowohl hydrophile als auch lipophile Wirkstoffe effektiv transportieren zu können, standen Liposomen schnell im Fokus als Arzneistoffträger und waren Inhalt vieler wissenschaftlicher Arbeiten, die sich beispielsweise mit der Zusammensetzung und Modifikation der Membran, der Herstellung oder dem *in vitro* oder *in vivo* Verhalten auseinandersetzten und dadurch wichtige Informationen zum Verständnis dieser Systeme lieferten (Sharma und Sharma 1997, Torchilin 2005, Deamer 2010). Zusätzlich sind die verwendeten Lipide biokompatibel und bioabbaubar, was ihnen aus toxikologischer Sicht einen Vorteil gegenüber anderen Grundbausteinen nanopartikulärer Systeme gewährt (van Hoogevest et al. 2011).

Folglich ist es nicht verwunderlich, dass die liposomale Formulierung Doxil® (Wirkstoff Doxorubicin) das erste von der FDA zugelassene nanopartikuläre Medikament darstellte und weitere Arzneimittel, in denen Liposomen als Trägersystem verwendet werden, in der Zwischenzeit zugelassen wurden oder aktuell in klinischen Studien untersucht werden.

Tabelle 1 gibt eine Übersicht über derzeitige Marktpräparate und Kandidaten, die sich in späten Phasen der Klinikstudien befinden. Anhand der gelisteten Wirkstoffe und damit verbundenen Indikationen ist zu erkennen, dass diese Präparate sich vor allem auf die stationäre Behandlung von Patienten beschränken und eine Injektion erfordern. Mit Arikace® (Wirkstoff Amikacin) steht erstmals auch ein inhalatives liposomales Medikament zur Behandlung zystischer Fibrose kurz vor der Zulassung und mit Pulmaquin® (Wirkstoff Ciprofloxacin) befindet sich ein weiteres inhalatives Produkt zur Behandlung von Bronchiektasen in der Klinischen Phase 3. Zusätzlich existieren im Bereich der freiverkäuflichen Medikamente verschiedene topische (v.a. Analgetika und Lokalanästhetika) und kosmetische Präparate auf Phospholipidbasis (PharmaCircle LLC 2016).

Tabelle 1: Übersicht über liposomale Marktprodukte und deren Zusammensetzung (Auszug). Modifiziert nach Allen und Cullis, ergänzt durch Daten aus PharmaCircle (Allen und Cullis 2013, PharmaCircle LLC 2016).

Wirkstoff	Handelsname	Zulassung	Lipidzusammensetzung	Applikationsform	Indikation
Amphotericin B	Abelcet®	1995	DMPC, DMPG	i.v.	Antimykotikum (verschiedene Infektionen)
	Ambisome®	1990	HSPC, DSPG, Cholesterol	i.v.	Antimykotikum (verschiedene Infektionen)
Bupivacain	Exparel®	2011	DEPC, DPPG, Cholesterol	intraläsional	Postoperative Schmerzen
Cytarabin	DepoCyt®	1999	DOPC, DPPG, Cholesterol, Triolein	intrathekal	Neoplastische Meningitis
Daunorubicin	DaunoXome®	1996	DSPC, Cholesterol	i.v.	Onkologie (Kaposi-Sarkom)
Doxorubicin	Myocet®	2000	EPC, Cholesterol	i.v.	Onkologie (Brust, metastasierend)
	Doxil®/Caelyx®	1995	HSPC, DSPE-PEG ₂₀₀₀ , Cholesterol	i.v.	Onkologie (Brust, metastasierend, Ovar, Kaposi-Sarkom)
	Lipodox®	2001	DSPC, DSPE-PEG ₂₀₀₀ , Cholesterol	i.v.	Onkologie (Brust, metastasierend, Ovar, Kaposi-Sarkom)
Irinotecan	Onivyde®	2015	DSPC, DSPE-PEG ₂₀₀₀ , Cholesterol	i.v.	Onkologie (Pankreas)
Mifamurtid	MEPACK®	2009	POPC, DOPS	i.v.	Onkologie (Osteosarkoma)
Morphinsulfat	DepoDur®	2004-2012	DOPC, DPPG, Cholesterol, Triolein	epidural	Postoperative Schmerzen
Verteporfin	Visudyne®	2000	DMPC, EPG	i.v.	Altersbedingte Makuladegeneration
Vincristinsulfat	Marqibo®	2012	ESM, Cholesterol	i.v.	Onkologie
Liposomale Vakzine (Virosomen)					
Hepatitis A Vakzin	Epaxal®	1999-2014	DOPC, DOPE	i.v.	Prävention für Hepatitis A
Influenza Vakzin	Inflexal V®	2002-2014	DOPC, DOPE	i.v.	Prävention für Influenza (saisonal)
Pipeline (Auszug)					
Amikacin	Arikace®	Registrierung	DPPC, Cholesterol	inhalativ	Bakterielle Infektion des respiratorischen Traktes
Cisplatin	Lipoplatin®	Phase 3	SPC, DPPG, DSPE-PEG ₂₀₀₀ , Cholesterol	i.v.	Onkologie (Bronchial, Kopf-Hals, Magen, Ovar, Pankreas)
Paclitaxel	EndoTAG-1®	Phase 3	DOPC, DOTAP	i.v.	Onkologie (Brust)

Neben der Erhöhung der Löslichkeit lipophiler und amphiphiler Wirkstoffe konnten in den parenteralen Produkten vor allem durch die Möglichkeit des passiven oder gewebespezifischen Targetings Dosis und Nebenwirkungen gegenüber nicht-liposomalen Präparaten verringert werden (Allen und Cullis 2013, Fan und Zhang 2013). Ebenso konnte eine verzögerte Wirkstofffreisetzung sowie eine verbesserte Penetration in Gewebe erzielt werden. Letzteres findet vor allem bei Analgetika Anwendung (Akbarzadeh et al. 2013).

Einen anderen Ansatz stellen die sogenannten Virosomen dar, die als liposomale Vakzine Verwendung finden. Hierbei handelt es sich um Vesikel, bestehend aus Phospholipiden und Cephalin, in denen die entsprechenden Glykoproteine in den Bilayer interkalieren (Bovier 2008, Fan und Zhang 2013). Epaxal und Inflexal V sind inaktivierte liposomale Vakzine, bei denen auf Aluminium als sonst typisches und in der Kritik stehendes Adjuvans als Wirkverstärker verzichtet werden konnte. Beide Produkte wurden von Crucell (Leiden, Niederlande) entwickelt und vermarktet und konnten in klinischen Studien aufgrund höherer Seroprotektivität und geringerer lokaler Nebenwirkungen ihre Überlegenheit gegenüber konventionellen Impfstoffen unter Beweis stellen. Der Vertrieb wurde allerdings im Jahr 2014 nach der Übernahme durch Janssen Pharmaceutica eingestellt (Hafner et al. 2014, PharmaCircle LLC 2016).

In der Entwicklung ist es wichtig, die Formulierung den entsprechenden Anforderungen anzupassen. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, zu überprüfen, inwiefern Liposomen eine Möglichkeit darstellen, einen lipophilen Wirkstoff systemisch zu applizieren. Im Folgenden soll daher zunächst auf generelle Aspekte des *in vivo*-Verhaltens von Liposomen eingegangen werden, bevor an ausgewählten Beispielen gezeigt wird, inwiefern dies durch die Formulierungsentwicklung zu steuern ist.

1.2.3 Grundlagen des *in vivo* Verhaltens von Liposomen

1.2.3.1 Systemische Applikation über Injektion

Tumorgewebe fördern eine sehr schnelle Angiogenese. Die gebildeten Blutgefäße weisen allerdings Störungen der Endothelschicht auf. Diese Öffnungen – sogenannte Fenestrierungen – können eine Größe von 200 bis 800 nm (Cho et al. 2008) erreichen und die Abscheidung von Makromolekülen oder auch nanopartikulären Trägersystemen – wie z.B. Liposomen – begünstigen. Sind diese Trägersysteme mit einem API beladen, kann dieser in dem Gewebe nach Aufnahme in die Zelle gezielt seine Wirkung entfalten. Dies wird als passives Targeting bezeichnet. Die Akkumulation wird zusätzlich durch die mangelhafte Ausbildung des Lymphsystems unterstützt, die einen Abtransport aus dem Gewebe erschwert. Dieser sogenannte EPR-Effekt (Enhanced Permeability and Retention) wurde zuerst von Matsumura und Maeda beschrieben und bildet heute einen wichtigen Therapieansatz in der Onkologie (Matsumura und Maeda 1986, Torchilin 2011). So konnte auch für Liposomen

gezeigt werden, dass diese sich selektiv im Tumorgewebe anreichern, wodurch die applizierte Wirkstoffdosis und dadurch die Nebenwirkungen reduziert werden konnte (Deshpande et al. 2013, Fan und Zhang 2013).

Dieses Konzept setzt allerdings voraus, dass die Liposomen hinreichend lange zirkulieren können, um das Zielgewebe intakt zu erreichen. Die Oberfläche herkömmlicher Liposomen wird jedoch nach Eintritt in das Blutsystem rasch von Plasmaproteinen (u.a. Opsonine) bedeckt, die von Zellen des mononukleären Phagozytensystems (MPS) erkannt werden (Yan et al. 2005). Anschließend werden die Vesikel von Monozyten bzw. Makrophagen phagozytiert und in Leber und Milz transportiert, wo der Wirkstoff akkumuliert (Kimelberg et al. 1976, Scherphof et al. 1985, Moghimi und Patel 1989, Pinto et al. 1991, Sharma und Sharma 1997). Eine andere Möglichkeit besteht in der Erkennung durch das Komplementsystem, das zur Lyse der Vesikel und Wirkstofffreisetzung führt. API, der auf diesem Weg eliminiert wird, steht der Therapie nicht zur Verfügung und kann gleichzeitig unerwünschte Nebenwirkungen in den Organen des MPS hervorrufen (Allen et al. 1984). Dieser Effekt kann abgesättigt werden und erklärt eine dosisabhängige Pharmakokinetik für herkömmliche Liposomen (Allen und Cullis 2013). Allerdings kann dieses Verhalten auch für eine gezielte Behandlung der Organe des MPS ausgenutzt werden (Sharma und Sharma 1997). Beispiele hierfür sind die Behandlungen der Leishmaniose oder von Pilzinfektionen mit Amphotericin B (New 1990). Für Doxorubicin-Liposomen konnte beobachtet werden, dass die Clearance durch das MPS über die Zeit abnahm, da die Phagozytose des Doxorubicin zum Absterben der verantwortlichen Zellen führte. Dies wiederum resultierte in einer verlängerten Zirkulationszeit der Formulierung mit zunehmender Behandlungsdauer (Bally et al. 1990).

Neben der Integrität der Vesikel muss ebenfalls sichergestellt werden, dass der Wirkstoff (erst) am Wirkort freigesetzt wird. Auch diese Anforderung stellt in der Praxis eine Herausforderungen dar. Hydrophobe Wirkstoffe werden in die Lipidmembran eingebaut. Sie stehen im systemischen Kreislauf in regelmäßigem Kontakt mit lipophilen Akzeptoren und können durch Kollisions- oder Diffusionsvorgänge z.B. auf Plasmabestandteile oder Erythrozyten transferiert werden (Allen und Cullis 2013, Decker et al. 2013a, Holzschuh et al. 2015). Gleichzeitig ist es möglich, dass hydrophile Substanzen, welche im Vesikelinneren eingeschlossen sind, durch Poren im Bilayer diffundieren und dadurch freigesetzt werden. Diese Öffnungen können ebenfalls durch Interaktionen des Bilayers mit Plasmaproteinen hervorgerufen werden (Papahadjopoulos et al. 1973, Guo et al. 1980). Ein solches Verhalten gilt es in der Regel zu vermeiden. Abschließend muss sichergestellt werden, dass der Wirkstoff am Wirkort freigesetzt wird.

Szebeni et al. beschrieben in einer Reihe von Publikationen eine Komplement-aktivierte Pseudoallergie (CARPA), die durch die Gabe von Liposomen induziert wird. Faktoren, die die

Ausprägung dieser Reaktion beeinflussen sind beispielsweise die Oberflächenladung oder der eingebaute Wirkstoff (Szebeni et al. 2012).

Subcutan applizierte Liposomen werden am Applikationsort oder nach Eintritt in die Lymphgefäße durch Makrophagen aufgenommen (Allen et al. 1993).

1.2.3.2 Inhalation

DPPC ist mit ca. 80 % der Hauptbestandteil des pulmonalen Surfactants. Aufgrund dieser hervorragenden Biokompatibilität eignen sich Liposomen als inhalatives Trägersystem. Nach Inhalation der Formulierung in Form eines gefrier- oder sprühgetrockneten Pulvers oder einer Lösung bzw. Suspension werden die Vesikel in Folge der alveolären Clearance des Surfactants über Epithelzellen aufgenommen, sodass der Wirkstoff – üblicherweise antiinflammatorisch oder antimikrobiell – schnell zur Verfügung steht. Bei der chronischen Anwendung konnte festgestellt werden, dass die Anzahl an Makrophagen zunahm, was zu einer erhöhten Clearance der Liposomen führte. Gleichzeitig kann aber auch hier dieser Mechanismus dazu genutzt werden, diese Immunzellen gezielt zu behandeln (Taylor und Newton 1992, Willis et al. 2012).

Andere Therapieansätze nutzen die amphiphilen Eigenschaften der Phospholipide aus, die Oberflächenspannung eines anderen Trägersystems herabsetzen zu können. So konnte gezeigt werden, dass basierend auf diesem Effekt der Zusatz von DPPC zu PLGA-Nanopartikeln deren Aufnahme durch alveoläre Makrophagen verringerte (Evora et al. 1998).

1.2.4 Möglichkeiten der Modifikation der Formulierung

Abbildung 2 gibt einen Überblick über die Möglichkeiten, das *in vivo*-Verhalten von Liposomen zu beeinflussen. Im Folgenden soll anhand von Beispielen gezeigt werden, inwiefern diese Faktoren z.B. die Freisetzung des Wirkstoffes oder die Aufnahme durch das MPS beeinflussen können. Dabei stehen die Lipidkomposition, der Zusatz von Cholesterol und die Oberflächenmodifikation mithilfe von PEGylierten Lipiden im praktischen Teil dieser Arbeit im Fokus.

1.2.4.1 Vesikelgröße

Partikelgröße und Partikelgrößenverteilung sind zwei Faktoren einer Formulierung, die sehr stark von der Herstellung abhängen (Sharma und Sharma 1997). Gleichzeitig haben diese Parameter einen Einfluss auf das *in vivo*-Verhalten der Liposomen.

Zum einen ist ein gewisser Größenbereich notwendig, um durch die Fenestrierungen in das Tumorgewebe zu gelangen. Hierfür sind kleinere Liposomen besser geeignet (Sharma und Sharma 1997). Zum anderen werden SUVs in geringerem Maße vom MPS erkannt und aufgenommen, was die Zirkulationszeit erhöht (New 1990).

Scherphof und Morselt beobachteten jedoch bei Versuchen in Rattenplasma, dass eine Verringerung der Partikelgröße mit einem erhöhten Abbau der Vesikel einherging. In heterogenen Populationen wurden ebenso zunächst Liposomen mit einem kleineren Durchmesser zerstört (Scherphof et al. 1978). Eine mögliche Erklärung hierfür ist die vergrößerte spezifische Oberfläche und erhöhte Krümmung von SUVs im Vergleich zu LUVs, was während der Zirkulation im Blutkreislauf zu vermehrten Interaktionen mit lipophilen Akzeptoren – z.B. Plasmabestandteilen – führen kann.

Anhand dieses Mechanismus ist es ebenso denkbar, dass lipophile Wirkstoffe, die in den Bilayer eingebaut sind, durch diesen Effekt schneller freigesetzt werden können. LUVs besitzen dagegen im Vergleich zu SUVs eine vergrößerte hydrophile Phase, wodurch mehr Wirkstoff pro Vesikel verkapselt werden kann (Sharma und Sharma 1997).

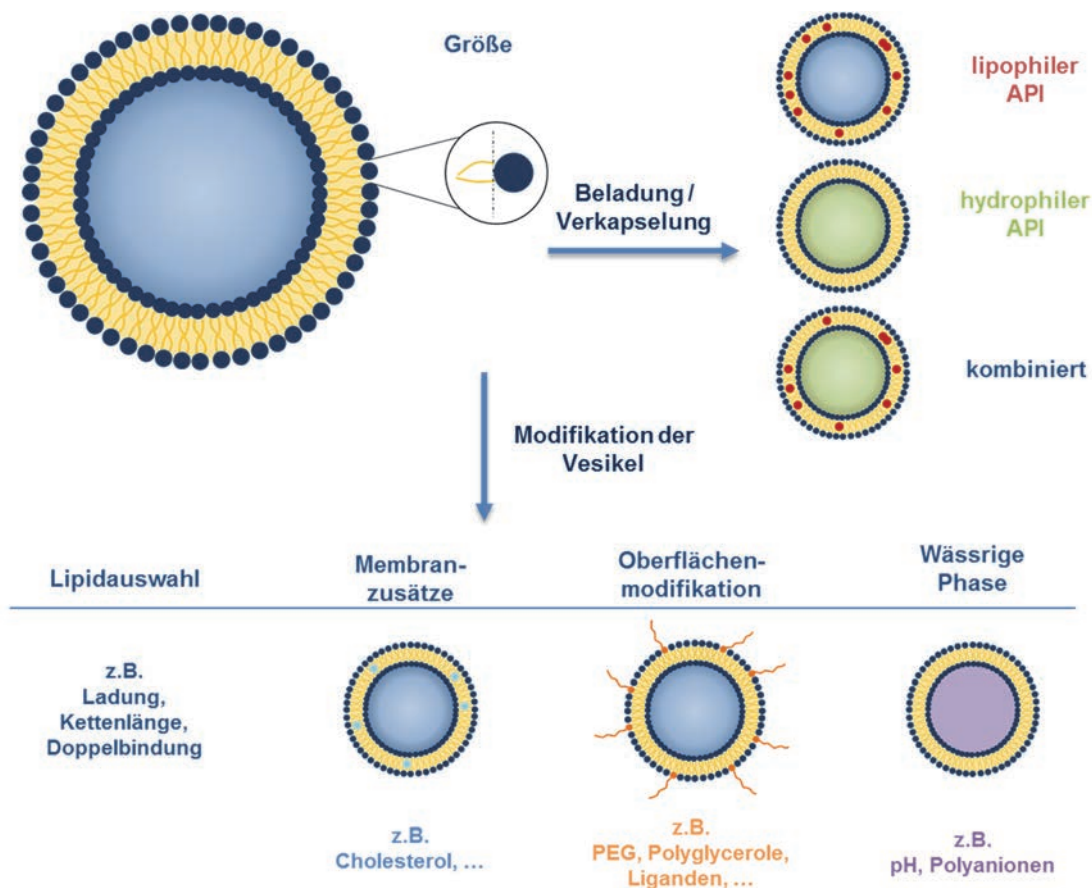


Abbildung 2: Möglichkeiten der Modifikationen der Formulierung, die einen Einfluss auf das *in vivo*-Verhalten der Liposomen haben können.

1.2.4.2 Lipidzusammensetzung

Die Eigenschaften der Phospholipide werden stark durch die Art der polaren Kopfgruppe und die verwendeten Alkylreste bestimmt.

Ersteres bestimmt die Ladung des Phospholipids, welche wiederum mit der Gesamtladung bzw. dem ζ -Potential des Vesikels korreliert. Ungeladene SUVs neigen zu verstärkter Aggregation und Fusion als geladene Liposomen (New 1990, Sharma und Straubinger 1994). Ebenso werden neutrale Vesikel bedeutend schlechter von Zellen aufgenommen, weswegen der Wirkstoff zunächst extrazellulär freigesetzt werden muss (Sharma et al. 1993). Andererseits zeigen ungeladene Liposomen im Blutkreislauf nur eine geringere Aufnahme durch das MPS (Gregoriadis 1992, Immordino et al. 2006a). Dies kann dadurch begründet werden, dass die negative Ladung als Bindungsstelle für Opsonine dienen kann oder direkt an der Bindung von Makrophagen beteiligt ist (Cevc 1993). Die Verwendung kationischer Lipide kann die Verkapselung negativ geladener Moleküle verbessern und die Aufnahme in die Zelle begünstigen. Durch die positive Ladung kommt es allerdings auch zu verstärkten Interaktionen mit Blutbestandteilen, wodurch sie schneller auf dem Kreislauf entfernt werden (Senior et al. 1991, Sharma und Sharma 1997, Immordino et al. 2006b). Derzeit befindet sich mit EndoTAG®-1 (Wirkstoff Paclitaxel) erstmals eine Formulierung in der klinischen Phase III, die mit DOTAP ein kationisches Lipid verwendet. Die positive Ladung der Liposomen zeigt eine Selektivität zur Tumervaskulatur und wird in diesem Fall dazu genutzt, das Wachstum des Tumors aktiv zu inhibieren (Chang und Yeh 2012).

Die Länge der verwendeten Alkylreste und die Anzahl der Doppelbindungen sind maßgeblich für die Phasenübergangstemperatur des jeweiligen Phospholipids verantwortlich. Dabei wird zwischen verschiedenen Übergängen unterschieden, die bei unterschiedlichen Temperaturen auftreten können. DPPC liegt bei 22°C im Gelzustand vor. Bei 35°C findet ein Subübergang statt, während bei 42°C der Hauptübergang vom Gel- in den flüssig-kristallinen Zustand beobachtet werden kann. Die letzte Phasenübergangstemperatur T_C wird auch als Übergang von der rigiden in die fluide Phase bezeichnet und stellt einen wichtigen Parameter für die folgenden Betrachtungen dar. In der rigiden Phase liegen die Lipidketten dicht gepackt vor, während sie in der fluiden Phase eine höhere Beweglichkeit aufweisen. Durch den daraus resultierenden erhöhten Platzbedarf steigt die Dicke des Bilayers von 3 bis 4 nm auf 5 bis 6 nm (Leonenko et al. 2004). T_C steigt mit zunehmender Kettenlänge und sinkt mit der Einführung von Doppelbindungen, da diese eine enge Packung der Phospholipidketten behindern.

Rigide Liposomen werden im Vergleich zu fluiden Liposomen in geringerem Maße vom MPS eliminiert und konnten eine verlängerte Zirkulationszeit zeigen (Gabizon und Papahadjopoulos 1988, Immordino et al. 2006a). Gleichzeitig konnte für hydrophile Wirkstoffe eine schnellere Freisetzung aus fluiden Liposomen beobachtet werden, da diese eine bessere Durchlässigkeit

für Wassermoleküle besitzen (Sharma und Sharma 1997, Allen und Cullis 2013). Für lipophile Substanzen ist es wichtig, die Lipidkomposition so zu wählen, dass der Wirkstoff besser in der Membran gehalten werden kann. So konnte für mTHPC-Liposomen (mTHPC = Temoporfin) gezeigt werden, dass diese den Wirkstoff mit zunehmender T_C schneller freisetzen (Hefesha et al. 2011, Decker et al. 2013a, Decker et al. 2013b).

Lipide bzw. Lipidgemische, die einen Phasenübergang knapp oberhalb der Körpertemperatur besitzen, werden in der Forschung zur Formulierung temperatursensitiver Liposomen verwendet. Diese Vesikel setzen den Wirkstoff erst oberhalb der Phasenübergangstemperatur frei. Nach Applikation und Verteilung im Kreislauf wird in den zu therapierenden Geweben eine leichte Hyperthermie hervorgerufen, sodass die Wirkung lokal erfolgen kann. Eine Mischung aus DPPC und Lyso-PCs stellt dafür eine mögliche Option dar (Grüll und Langereis 2012).

1.2.4.3 Membranadditive

Eine andere Möglichkeit, die Eigenschaften des Bilayers zu beeinflussen, ist der Einbau zusätzlicher Moleküle. Das dabei am häufigsten verwendete Molekül stellt der amphiphile polyzyklische Alkohol Cholesterol dar, der ebenfalls ein Bestandteil biologischer Membranen ist und sich zu mehr als 50 % (mol/mol) in den Bilayer einarbeiten lässt (Cooper 1978, New 1990, Magarkar et al. 2014).

Es ist bekannt, dass Cholesterol oberhalb der Phasenübergangstemperatur – also in fluiden Liposomen – die Rigidität erhöhen kann. Eeman und Deleu erklären diese Eigenschaft durch Ausbildung einer lamellaren flüssig-geordneten Phase. Diese Phase entsteht durch Interaktion des Cholesterols mit den Phospholipiden. Im Falle eines fluiden Bilayers erhöht es die Ordnung, wohingegen es in einem rigiden Bilayer die Packung der Lipidmoleküle stört. Folglich wird in diesen Vesikeln die Fluidität erhöht (Eeman und Deleu 2010). Zusätzlich weist Cholesterol einen kondensierenden Effekt auf gesättigte Fettsäuren auf (Decker et al. 2012). Dieser Effekt kann die Versteifung fluider Membranen zusätzlich verstärken. Durch die Erhöhung der Rigidität kann der Einbau von Cholesterol die Wirkstofffreisetzung hydrophiler Substanzen verringern (Allen und Cleland 1980). Ebenso kann auf diese Weise die Elimination durch das MPS verringert werden (Immordino et al. 2006a).

Auch andere Substanzen – im Speziellen in den Bilayer eingebaute Wirkstoffe – können grundsätzlich einen Einfluss auf die Membraneigenschaften (T_C , Steifigkeit u.a.) haben (Kuntsche et al. 2010, Decker et al. 2012). Ferner können temperatur- oder pH-sensitive Polymere verwendet werden, um eine gezielte Freisetzung am gewünschten Wirkort zu ermöglichen. Letztere sind bei physiologischem pH stabil, werden z.B. im Tumorgewebe akkumuliert und setzen den Wirkstoff aufgrund des leicht sauren pH-Wertes entweder dort oder nach Endozytose in den Zellen frei. Polymerisierte oder anderweitig modifizierte Lipide,

Peptide oder synthetische Polymere werden für diesen Zweck in den Bilayer eingebaut (Moussa et al. 2015).

1.2.4.4 Oberflächenmodifikation

Eine der wichtigsten Entwicklungen im Bereich der Liposomen war die Entwicklung sogenannter Stealth-Liposomen (Allen und Hansen 1991). Hierbei handelt es sich um Vesikel, deren Oberfläche beispielsweise mit PEGylierten Lipiden modifiziert wurde. Polyethylenglykol (PEG) ist ein von den Gesundheitsbehörden anerkanntes und in der Nanomedizin verwendetes Molekül, das eine Reihe von positiven Eigenschaften aufweist, z.B. eine relativ hohe Biokompatibilität, Löslichkeit in wässrigen und organischen Medien, geringe Immunogenität und eine gute Elimination (Immordino et al. 2006a). Da es sich um ein synthetisches Polymer handelt, können seine Eigenschaften über die Kettenlänge den gewünschten Anforderungen angepasst werden. Üblicherweise wird es heute an ein DSPE-Grundgerüst gekoppelt und stellt das am häufigsten verwendete Polymer dar.

PEGylierte Liposomen zeigen in der Praxis aufgrund sterischer Abschirmung eine deutlich reduzierte Absorption von Plasmaproteinen und eine verringerte Aufnahme durch das MPS (Blume und Cevc 1993), verbunden mit einer verlängerten Zirkulationszeit (Sharma und Sharma 1997). Lange PEG-Ketten und eine hohe Konzentration PEGylierter Lipide an der Liposomenoberfläche begünstigen diesen Effekt (Allen et al. 1991). Gleichzeitig retardiert es die Wirkstofffreisetzung hydrophiler Substanzen. Aus diesem Grund finden Stealth-Liposomen in der Praxis bereits in verschiedenen Marktprodukten Anwendung (Vergleiche Tabelle 1). Während bei der konventionellen Myocet®-Formulierung, die zur Behandlung metastasierenden Brustkrebs eingesetzt wird, eine schnelle Freisetzung von Doxorubicin beobachtet werden kann, setzt das PEGylierte Caelyx® den Wirkstoff deutlich langsamer frei und zeigt aufgrund der verlängerten Zirkulationszeit eine andere Verteilung im Körper. In diesem Fall wird Doxorubicin vermehrt in der Haut abgelagert, wodurch eine verbesserte Therapie des Kaposi-Sarkoms möglich ist (Abraham et al. 2005).

Auf der anderen Seite konnten Decker et al. *in vitro* und *in vivo* zeigen, dass der hydrophobe Wirkstoff Temoporfin aus PEGylierten rigiden Liposomen schneller freigesetzt wurde als aus der nicht modifizierten Formulierung (Decker et al. 2013a, Decker et al. 2013b).

Die Pharmakokinetik PEGylierter Liposomen ist dosisunabhängig (Allen und Hansen 1991). Allerdings kann die wiederholte Gabe PEGylierter Liposomen zu einer Veränderung des pharmakokinetischen Verhaltens führen (Ishida et al. 2003). Dieser sogenannte ABC-Effekt (accelerated blood clearance) konnte vor allem für geringe Dosen beobachtet werden (Ishida et al. 2005) und beruht vermutlich auf einer Erkennung der PEG-Ketten durch das Immunsystem, Bildung von Immunglobulinen des Typs M, Opsonierung und anschließend schnellerer Clearance bei wiederholter Applikation. Dieser Effekt ist über die Zeit reversibel.

Interessanterweise tritt derselbe Effekt aber ebenfalls auf, wenn hohe Lipiddosen konventioneller Liposomen mehrfach appliziert werden (Ishida et al. 2005, Knop et al. 2010, Allen und Cullis 2013).

Ein weiterer Nachteil PEGylierter Liposomen sind die verringerte Interaktion mit Zellen, die eine Aufnahme des Wirkstoffes erschwert und fehlende Bioabbaubarkeit (Sharma und Sharma 1997). In der Literatur werden daher mögliche Alternativen – Polyaminosäuren, Polyglycerole oder Polyoxazoline (Knop et al. 2010), als auch Derivate synthetischer Polymere (Torchilin 2005) – zur Erhöhung der Zirkulationsdauer beschrieben.

Eine Oberflächenmodifikation für ein aktives Targeting beruht auf der Konjugation unterschiedlicher Vektoren an der Liposomenoberfläche. Diese Vektoren sind üblicherweise gegen spezifische Strukturen auf Zellen gerichtet und ermöglichen eine selektive Bindung (Rüger 2008).

1.2.4.5 Wässrige Phase

Die Modifikation der inneren wässrigen Phase stellt eine Möglichkeit dar, die Verkapselungseffizienz von hydrophilen Wirkstoffen zu erhöhen. Dabei werden Methoden verwendet, die die Löslichkeit des Wirkstoffes erhöhen und gleichzeitig das Bestreben des Wirkstoffes, durch den Bilayer nach außen zu diffundieren, verringern.

Praktisch findet dies bei der liposomalen Formulierungen von Anthracyclinen Anwendung. Doxorubicin ist amphiphil und dadurch in der Lage, sich sowohl im Bilayer als auch in der wässrigen Phase zu lösen. Dies wiederum kann dazu führen, dass der Wirkstoff während der Blutzirkulation kontinuierlich freigesetzt wird. Durch Reduktion des pH-Wertes der inneren Phase kann die Wasserlöslichkeit erhöht werden. Ist der pH-Wert der äußeren Phase höher, kann durch Aufbau eines transmembranen pH-Gradienten sichergestellt werden, dass zugegebenes Doxorubicin unter geeigneten Bedingungen (Temperatur, Puffer, ...) zunächst in den Bilayer aufgenommen wird und sich anschließend in der inneren Phase löst und dort „gefangen“ wird, da in ionisierter Form kein Rücktransport über die Membran möglich ist. Wird dabei die Löslichkeit überschritten, bildet der Wirkstoff faserförmige Präzipitate, die unter dem Elektronenmikroskop erkennbar sind. Auf diese Weise können Verkapselungseffizienzen von nahezu 100 % erreicht werden und Doxorubicin in einem Masseverhältnis von bis zu 30 %, bezogen auf das Lipid, eingeschlossen werden (Abraham et al. 2005). Diese Methode wurde zunächst von Madden et al. beschrieben, die ihre Liposomen in Citratpuffer herstellten und anschließend den pH-Wert der äußeren Phase erhöhten (Madden et al. 1990). Diese Methode findet auch bei der Herstellung von Myocet® Anwendung. Eine andere Möglichkeit stellt die Herstellung in einem Ammoniumpuffer dar. *In situ* gebildetes Ammoniak ist in der Lage durch die Membran zu diffundieren. Durch Zurücklassen eines Protons sinkt der pH-Wert. Durch Umpufferung der äußeren Phase – z.B. über Gelchromatographie – wird auf diese Weise ein

pH-Gradient hergestellt, der ebenfalls in der Lage ist, Doxorubicin effektiv zu verkapseln. Ammoniumsulfat wird zur Ausbildung eines pH-Gradienten bei der Herstellung von Doxil® angewendet (Abraham et al. 2005, Fritze et al. 2006).

Eine dritte Möglichkeit ist die Verwendung eines Mangan-Gradienten. Mn^{2+} -Ionen bilden mit Doxorubicin Chelatkomplexe (Cheung et al. 1998). Die Bildung von Metallkomplexen erscheint aber auch für andere Wirkstoffe möglich (Gubernator 2011). Drummond et al. verwendeten Polyanionen zur verbesserten Verkapselung von Irinotecan. Sie konnten zeigen, dass auf diese Weise die Zirkulationszeit und Stabilität des Wirkstoffes erhöht werden konnten (Drummond et al. 2006)

1.2.4.6 Zusammenfassung

Basierend auf den zuvor erwähnten Modifikationsmöglichkeiten lassen sich verschiedene Strategien zur Anwendung von Liposomen als Arzneistoffträgersystem zusammenfassen.

- Werden Liposomen lediglich zur Erhöhung der Löslichkeit verwendet, können sehr kleine, im Blutkreislauf instabile Liposomen den Wirkstoff schnell freisetzen. Ebenso ist es für lipophile Wirkstoffe denkbar, eine Lipidkombination zu wählen, die den API weniger gut in der Membran halten kann. Fluide Liposomen können die schnelle Freisetzung hydrophiler Wirkstoffe begünstigen. Darüber hinaus bieten sich LUVs, deren Oberfläche nicht modifiziert wurde, an, um eine schnelle Wirkstofffreisetzung zu erzielen oder Organe des MPS gezielt zu therapieren.
- Besteht die Absicht eines Targetings, können Liposomen verwendet werden, deren Membran durch die Wahl der Lipide oder den Einbau von Cholesterol eine gewisse Rigidität aufweist, damit ein in der hydrophilen Phase verkapselter Wirkstoff stabiler eingeschlossen wird. Gleichzeitig kann eine erhöhte Stabilität der Vesikel im Kreislauf gewährleistet werden. Sie kann zusätzlich durch eine PEGylierung der Membranoberfläche verbessert werden. Lipophile Wirkstoffe sollten für ein solches Vorhaben tief im Bilayer eingebaut, um den Kontakt mit lipophilen Akzeptoren zu minimieren. Sterische Abschirmung bietet hierfür ggf. eine weitere Option. Die Konjugation mit Vektoren stellt eine Möglichkeit dar, gewünschte Gewebe durch aktives Targeting gezielt zu therapieren.

1.3 Temoporfin

Meso-tetrahydroxyphenylchlorin (mTHPC) bzw. Temoporfin ist ein Photosensibilisator (Photosensitizer) der zweiten Generation, der in einer ethanol- und propylenglykolhaltigen Lösung (Foscan®, biolitec GmbH, Jena, Deutschland) zur photodynamischen Behandlung von Kopf-Hals-Krebs angewandt wird (Senge und Brandt 2011). Es wurde erstmals von Bonnett et al. beschrieben (Bonnett et al. 1989).

1.3.1 Photodynamische Therapie (PDT)

Das Prinzip der photodynamischen Therapie beruht auf der spezifischen Bestrahlung von beispielsweise Tumorgewebe mit Licht einer definierten Wellenlänge und der daraus resultierenden Aktivierung eines nicht toxischen Photosensitizers – z.B. mTHPC – in den angeregten Zustand (Tripletzustand). Nach Rückkehr in den Grundzustand wird die hierdurch freigesetzte Energie auf reaktive Sauerstoffspezies (ROS) übertragen. Im Folgenden werden zwei Reaktionstypen unterschieden, die beide Sauerstoff benötigen. Bei einer Typ 1-Reaktion findet eine direkte Reaktion mit einem Substrat unter Radikalbildung statt. Die Radikale bilden in einer weiteren Reaktion mit Sauerstoff oxidative Reaktionsprodukte. Bei einer Typ 2-Reaktion kommt es direkt zur Bildung von Singulett-Sauerstoff. Beide Reaktionen laufen gleichzeitig ab. Die gebildeten Oxidationsprodukte können über den Zelltodmechanismus das Gewebe direkt zerstören, das Tumorgefäßsystem schädigen oder eine Immunreaktion gegen die Tumorzellen hervorrufen (Dolmans et al. 2003). Der Ablauf ist schematisch in Abbildung 3 skizziert.

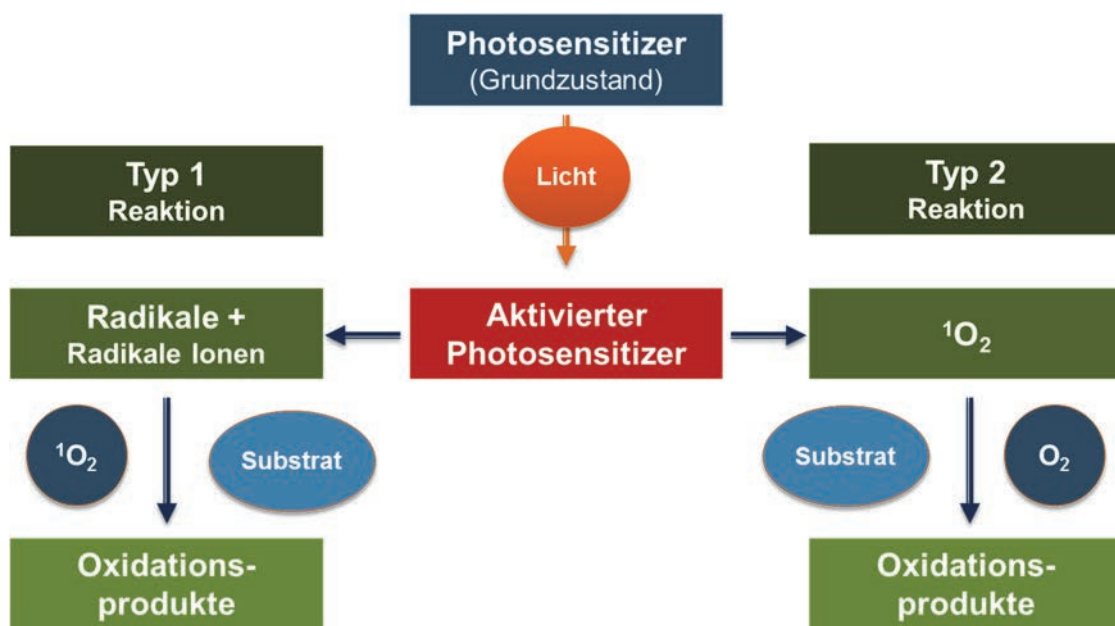


Abbildung 3: Prinzip der photodynamischen Therapie und der möglichen Reaktionstypen. In beiden Fällen kommt es zur Ausbildung oxidativer Produkte, die im Folgenden das Gewebe direkt zerstören können, das Tumorgefäßsystem schädigen oder eine Immunreaktion gegen die Tumorzellen hervorrufen. Modifiziert nach Dolmans et al. (Dolmans et al. 2003).

PDT konnte in verschiedenen Indikationen seine Wirkung unter Beweis stellen und bietet im Vergleich zu konventionellen Behandlungsmöglichkeiten von Tumoren, bedingt durch eine höhere Selektivität, eine kostengünstigere Alternative mit verringerten Nebenwirkungen. Der Anwendungszeitraum ist vergleichsweise kurz und kann wiederholt werden (Chatterjee et al. 2008).

1.3.2 Physikochemische Eigenschaften

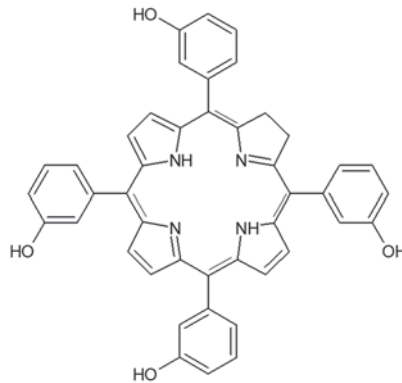


Abbildung 4: Chemische Struktur von mTHPC.

Temoporfin ist unter physiologischen Bedingungen ein neutrales, schwerlösliches Molekül mit einem berechneten log P-Wert von 8,8 (NCBI 2004-2016) bzw. 9,24 (Chen et al. 2011). Im ungeladenen Zustand kann es sehr gut in Biomembranen aufgenommen werden. Die chemische Struktur ist in Abbildung 4 dargestellt. Das vorhandene π -konjugierte Chlorin-Grundgerüst stellt ein Chromophor dar, das ein Absorptionsmaximum bei 650 nm besitzt und bei dieser Wellenlänge angeregt werden kann. mTHPC ist photoinstabil und zeigt Photobleaching (Senge und Brandt 2011).

1.3.3 Pharmakokinetische Untersuchungen

1.3.3.1 Foscan®

In vitro konnte eine Bindung an Lipoproteine in Höhe von 84 % bestimmt werden, wobei HDL und LDL die größten Mengen des Photosensitizers binden konnten (Michael-Titus et al. 1995). In einer klinischen Phase I Studie wurde die maximale Plasmakonzentration nach 10 bis 24 h gemessen, bei einer Plasmahalbwertszeit von 30 bis 45 h. Hierbei spielen Aggregationsphänomene nach der Injektion, die hohe Plasmaproteinbindung sowie eine initiale Akkumulation in der Leber eine wichtige Rolle. Aus dieser Akkumulation entwickelt sich anschließend ein enterohepatischer Kreislauf oder es erfolgt die Ausscheidung über die Fäzes (Glanzmann et al. 1998, Senge und Brandt 2011).

Nach erfolgter Injektion und Zirkulation im Blutkreislauf reichert sich der Wirkstoff zunächst in vaskulären Endothelzellen an. In der Folge wird er langsam in das extravasale Kompartiment freigegeben und von den Zellen – z.B. im Tumorgewebe – aufgenommen. Aus diesem Grund erfolgt die Bestrahlung des Gewebes auch erst mehrere Stunden bis Tage nach der Applikation (Dolmans et al. 2003).

1.3.3.2 Liposomales mTHPC

Bei der Anwendung von Foscan® werden verschiedene Nebenwirkungen beschrieben, die in vielen Fällen durch die ethanolhaltige Formulierung bedingt sind, z.B. Schmerzen an der Injektionsstelle (European Medicines Agency 2013). Durch die geringe Löslichkeit im wässrigen Milieu besteht zusätzlich die Gefahr, dass mTHPC an der Injektionsstelle präzipitiert und hier Nekrosen auftreten können (Yang et al. 2012). Zusätzlich müssen sich die Patienten eine erhebliche Zeit lang strikt vor der Sonne schützen. Dieser Zeitraum könnte durch eine verbesserte Pharmakokinetik deutlich verkürzt werden.

Alternative Formulierungsstrategien stehen daher im Fokus einiger wissenschaftlicher Arbeiten. Neben verschiedenen mTHPC-Nanopartikeln oder Mizellen, befinden sich mit Foslip® (DPPC/DPPG) und Fospeg® (DPPC/DPPG/mPEG₂₀₀₀-DSPE) auch zwei liposomale Produkte in der Entwicklung. Weitere mTHPC-Liposomen werden in der Literatur beschrieben. Temoporfin lässt sich sehr gut in die Liposomenmembran einbauen (Kuntsche et al. 2010). Auf diesem Weg können die genannten Applikationsprobleme gelöst werden. Gleichzeitig bietet der EPR-Effekt eine zusätzliche Möglichkeit des passiven Targetings des Tumorgewebes (Vergleiche 1.2.3).

Decker et al. untersuchten das *in vivo*-Verhalten unterschiedlicher mTHPC-Liposomen in Ratten über 24 Stunden. Dabei konnten sie feststellen, dass rigide Liposomen den Wirkstoff schneller freigaben als Vesikel im flüssig-kristallinen Zustand. Temoporfin lag im Kreislauf liposomal oder an Blutbestandteile gebunden vor. Lipid und mTHPC konnten nach 24 h ebenfalls in der Milz oder Leber wiedergefunden werden. Spuren von mTHPC wurden ebenso in der Lunge detektiert, was auf Membraninteraktionen hindeutet (Decker et al. 2013a). Auch *in vitro*-Studien zeigten, dass liposomales mTHPC im Blut in Abhängigkeit von der Formulierung unterschiedlich schnell freigesetzt wird und an Erythrozyten und Plasmaproteine bindet. Hauptakzeptor sind – analog zu Foscan® – HDL und LDL (Reshetov et al. 2012, Decker et al. 2013b, Kaess und Fahr 2014).

1.4 *In vitro*-Modelle zur Abschätzung der *in vivo*-Pharmakokinetik liposomaler Formulierungen

Die Durchführung von *in vivo*-Studien ist aufwendig und kostenintensiv. Aus diesem Grund werden Modelle benötigt, die frühzeitig eine Abschätzung über das spätere Verhalten im menschlichen Körper ermöglichen. Im Bereich der Pharmakodynamik steht ein breites Spektrum an *in vitro*-Zellmodellen zur Verfügung, die durch Fortschritte im Bereich der Gentechnik den entsprechenden Anforderungen angepasst werden können. Damit eine Substanz jedoch seine pharmakologische Wirkung entfalten kann, muss auch sichergestellt werden, dass diese dem Körper bzw. dem Zielgewebe in ausreichender Menge zur Verfügung steht.

Im Bereich der oralen Formulierungen existieren definierte Freisetzungs- und Permeationsmodelle, die die Liberation und Absorption eines Wirkstoffes simulieren können. Beispiele hierfür sind die im Europäischen Arzneibuch beschriebenen Methoden der Blattrührerapparatur und Diffusionszelle, das Everted-Sac- oder Caco-2-Modell.

Für parenterale Formulierungen – im Speziellen jene, die ein Trägersystem verwenden, aus dem der Wirkstoff freigesetzt werden kann / muss – stehen solch allgemeine und standardisierte Modelle jedoch nicht zur Verfügung.

Auf dem Gebiet der Liposomen liefert die Literatur verschiedene Ansätze, die zum Verständnis des Membranaufbaus, der Stabilität und Wirkstofffreisetzung beitragen. Im Folgenden sollen einige dieser Systeme kurz vorgestellt werden, die sich auf lipophile Wirkstoffe konzentrieren. Da in der vorliegenden Arbeit Versuche an der Langmuir-Filmwaage sowie der Asymmetrischen Feld Fluss-Feld Fraktionierung durchgeführt wurden, sollen diese Systeme etwas detaillierter betrachtet werden.

1.4.1 Membranaffinität

Eine erste Gruppe von Studien beschäftigt sich mit der Affinität von Wirkstoffen zu Membranen oder Phospholipiden und das dazugehörige Verteilungsverhalten.

Eine Reihe von Arbeiten bedient sich dabei der HPLC-Technik, indem modifizierte Säulen verwendet werden, um die Interaktion eines Wirkstoffes mit Membranen zu simulieren. Dieses Modell kann dazu genutzt werden, um abzuschätzen, wie gut ein API in die Haut aufgenommen werden kann. Die berechneten Verteilungskoeffizienten stellen dabei einen realistischeren Wert dar als beispielsweise der Octanol-Wasser-Koeffizient $\log P$. Immobilisierte artifizielle Membranen (IAM) können als eine solche stationäre Phase verwendet werden, um das Retentionsverhalten von Wirkstoffen zu untersuchen (Liu et al. 2008).

Zhang et al. nutzen in einer Variante der Kapillarelektrophorese (Liposome Electrokinetic Chromatography – LEKC) Cerasomen als stationäre Phase. Übliche Bestandteile von Cerasomen sind hydriertes Lecithin, Cholesterol, Ceramide sowie die freien Fettsäuren Palmitin- und Ölsäure. Diese Vesikel sind für Aussagen über die Permeabilität eines Wirkstoffs durch die Haut geeigneter als herkömmliche Liposomen, da sie die Lipidzusammensetzung des Stratum Corneums besser simulieren können (Zhang et al. 2011).

1.4.2 Transfer zwischen Modellmembranen

Liposomen werden ebenfalls verwendet, um das Transferverhalten lipophiler Wirkstoffe zwischen Modellmembranen zu untersuchen. Diese Systeme können in der Regel auch dazu verwendet werden, Aussagen zur Membranaffinität zu tätigen, da diese einen wichtigen Einfluss auf das Transferbestreben und die Transferkinetik hat.

Für den Transfer eines Membranbausteins zwischen zwei Modellmembranen wurden unterschiedliche Mechanismen beschrieben. Ein erster beschreibt einen Austausch, der durch Kollision hervorgerufen wird. Ein anderer stellt einen diffusionsbedingten Transfer durch die wässrige Phase dar. In anderen Studien konnte eine Überlappung beider Phänomene beobachtet werden. Letztlich hängt der Mechanismus vom zu transferierenden Bestandteil, seiner Beladungsmenge und seiner Affinität zum Bilayer ab (Fahr et al. 2005).

Der Transfer zwischen zwei liposomalen Membranen stellt dabei einen häufig verwendeten Ansatzpunkt dar. In diesen Studien werden zwei Membransysteme miteinander inkubiert und der Austausch zwischen den Membranen über die Zeit beobachtet. Die analytische Auswertung erfordert häufig über eine Trennung der Donor- und Akzeptorpopulation, die in der Regel aufgrund unterschiedlicher physikochemischer Parameter erfolgt, z.B. Ladung, Größe oder Dichte (New 1990).

Eine beliebte Methode stellt dabei die Ionenaustauscherchromatographie dar, um den Transfer eines Membranbausteins aus geladenen Liposomen auf neutrale Akzeptoren zu messen. Fahr et al. nutzten diese Methode, um den Transfer von Cyclosporin A aus negativen Donorvesikeln zu untersuchen (Fahr und Seelig 2001). Andere Studien verwendeten diese Methode zur Untersuchung des Transfers von Cholesterol, Fettsäuren und Phospholipiden. Hefesha et al. bestimmten auf diese Weise das Transferverhalten Temoporfin in Abhängigkeit der Lipidzusammensetzung aus positiv oder negativ geladenen Donorliposomen (Hefesha et al. 2011).

Ultrazentrifugation, Dialyse oder Größenausschlusschromatographie (Vergleiche 1.4.3) stellen drei Methoden dar, die zur Aufreinigung von Liposomen bei der Herstellung und anschließender Bestimmung der Beladungseffizienz verwendet werden. Im gleichen Maße können sie jedoch auch zur Auftrennung großer und kleiner Vesikel verwendet werden (New 1990).

1.4.3 Transfer an endogene Membranen

Zusätzlich zu den unter 1.4.2 beschriebenen Arten des Transfers (im Folgenden als passiv bezeichnet) sind in Gegenwart von endogenen Membranen – z.B. im Plasma oder Vollblut – zwei weitere Mechanismen denkbar. Zunächst kann es beispielsweise enzymatisch zur Zerstörung des Vesikels kommen, was zu einer sofortigen Freisetzung des Wirkstoffs führen würde. Auch ein aktiver Transfer des APIs ist über lipophile Transporter möglich. Eine Zusammenfassung hierzu findet sich in Abbildung 5, die mögliche Mechanismen und Akzeptoren in humanem Plasma skizziert.

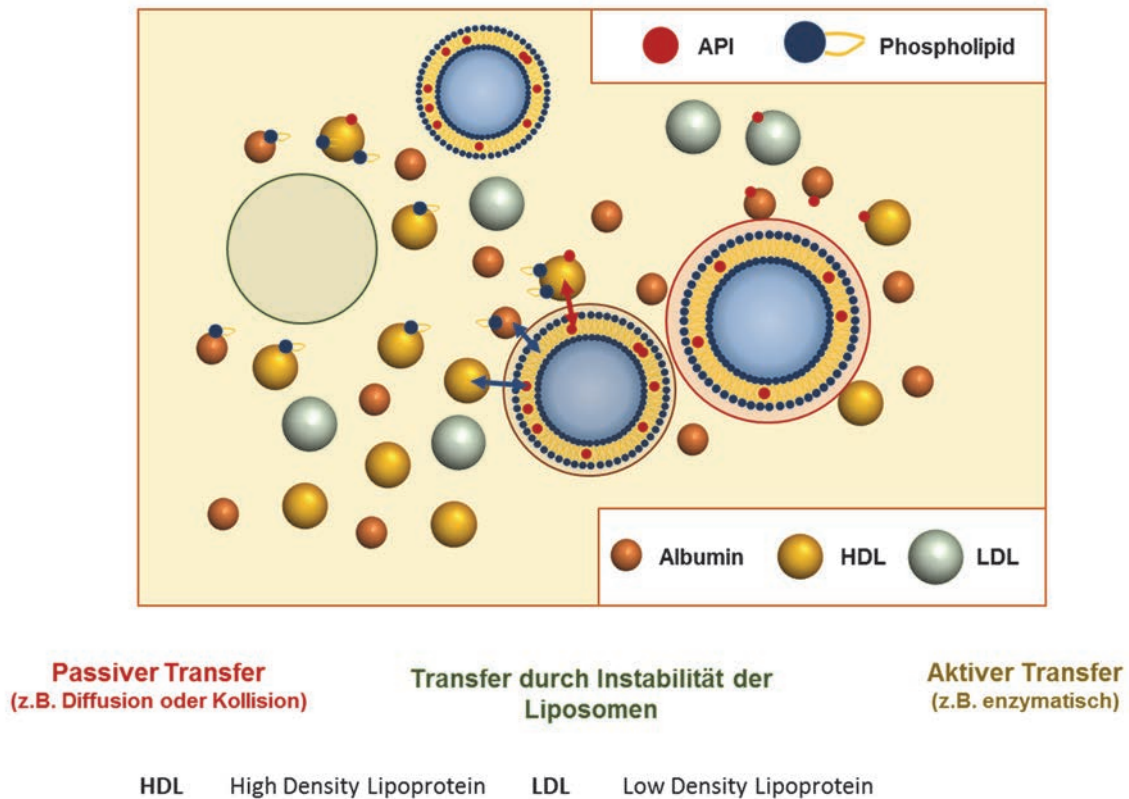


Abbildung 5: Mögliche Transfermechanismen eines lipophilen Wirkstoffes aus Liposomen in humanem Plasma. Plasmaproteine (stellvertretend ist Albumin dargestellt) und Lipoproteine stellen mögliche Akzeptoren dar.

Choice et al. nutzten den Größenunterschied zwischen Plasmaproteinen und Liposomen aus, um das Verhalten der Vesikel in Plasma zu untersuchen (Choice et al. 1999). Die von ihnen gewählte Methode der Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC) stellt eine Variante der Größenausschluss- bzw. Gelpermeationschromatographie (SEC / GPC) dar. Das Trennprinzip beruht darauf, dass die Retention von Partikeln in einer Säule, die mit einem Gel einer definierten Porengröße gepackt ist, vom hydrodynamischen Volumen abhängt. Kleinere Partikel eluieren langsamer als große (Moore 1964, Grubisic et al. 1967, Benoit 1996). In neueren Studien wurde diese Methode aufgegriffen, um das Transferverhalten von liposomalem Temoporfin auf Plasmaproteine zu untersuchen (Decker et al. 2013b, Kaess und Fahr 2014). Vorteile dieser Methode sind die gute Auftrennung über einen variablen Größenbereich (nm bis μm), die zusätzlich durch die Wahl des Gels, die Maße der Säule oder die Flussrate gesteuert werden kann. Nachteilig können Interaktionen mit der stationären Phase oder die vergleichsweise lange Trennzeit sein (Berek 2010, Wagner et al. 2014). Chonn et al. konnten zeigen, dass auch Säulen mit einem sehr kleinen Volumen in Verbindung mit Zentrifugation (Spin Columns) zur Auftrennung von LUVs und Plasmaproteinen verwendet werden können. Dabei bedingt die sehr kurze Trennzeit eine verschlechterte Auftrennung (Chonn et al. 1991).

Reshetov et al. nutzten zusätzlich zur SEC die Nanotracking-Technologie (NTA), um das Verhalten von mTHPC-Liposomen in humanem Plasma zu untersuchen. NTA-Messungen beruhen auf der Visualisierung von Partikeln, die in Lösung Laserlicht streuen. Durch Montage einer Kamera auf ein Mikroskop kann die Bewegung einzelner Partikel verfolgt werden. Üblicherweise wird hieraus über die Stokes-Einstein-Gleichung die hydrodynamische Partikelgröße ermittelt (Malvern Instruments Ltd 2016). In der zitierten Arbeit wurde jedoch auf diese Weise der Abbau der Vesikel verfolgt (Reshetov et al. 2012). In einer früheren Arbeit nutzten sie das Quenching von mTHPC im Bilayer aus, um die Interaktion mit Plasmaproteinen zu bestimmen. Durch die Freisetzung des Wirkstoffes erhöhte sich die Fluoreszenzintensität in den Liposomen, woraus anschließend Transferkinetiken ermittelt wurden (Reshetov et al. 2011).

Ultrazentrifugation wurde ebenfalls genutzt, um Wechselwirkungen zwischen Liposomen und einzelnen Plasmabestandteilen zu untersuchen. Hierbei erfolgte die Auftrennung über einen Dichtegradienten (Guo et al. 1980). An dieser Stelle sei erwähnt, dass die Absorption von Proteinen die Dichte der Vesikel verändern kann. Gleichzeitig kann eine Überlappung der Dichten der Liposomen und Proteinfractionen beobachtet werden, die eine Auftrennung erschwert (New 1990). Ein Ansatz, dieses Problem zu lösen, bietet die Erhöhung der Dichte der Vesikel, z.B. durch Verwendung einer hochprozentigen Sucroslösung als innere Phase (Buser und McLaughlin 1998). Zentrifugation ist auch eine Möglichkeit, um Liposomen von Blutzellen – etwa Erythrozyten – zu trennen (Decker et al. 2013b).

1.4.4 Asymmetrische Fluss Feld-Fluss Fraktionierung

Partikeltrennung anhand von Feld-Fluss Fraktionierung beruht auf den Arbeiten von Giddings aus den 60er Jahren. Heute stellt die Asymmetrische Fluss Feld-Fluss Fraktionierung (AF4) die am häufigsten verwendete Variante dar. Sie wurde 1987 als erstes von Wahlund und Giddings beschrieben und seitdem vor allem zur Auftrennung und Charakterisierung kolloidaler Partikel und Partikelgemische verwendet. Hierbei werden die Teilchen anhand ihres hydrodynamischen Durchmessers aufgetrennt. (Wahlund und Giddings 1987) Ein schematischer Aufbau, der den Querschnitt eines Trennkanals darstellt, ist in Abbildung 6 skizziert. Im Folgenden werden Inhalte aus Veröffentlichung 1 zusammengefasst, um das Trennprinzip sowie einige Anwendungsbeispiele vorzustellen. Für detailliertere Informationen sei an dieser Stelle auf diese Publikation verwiesen (Wagner et al. 2014).

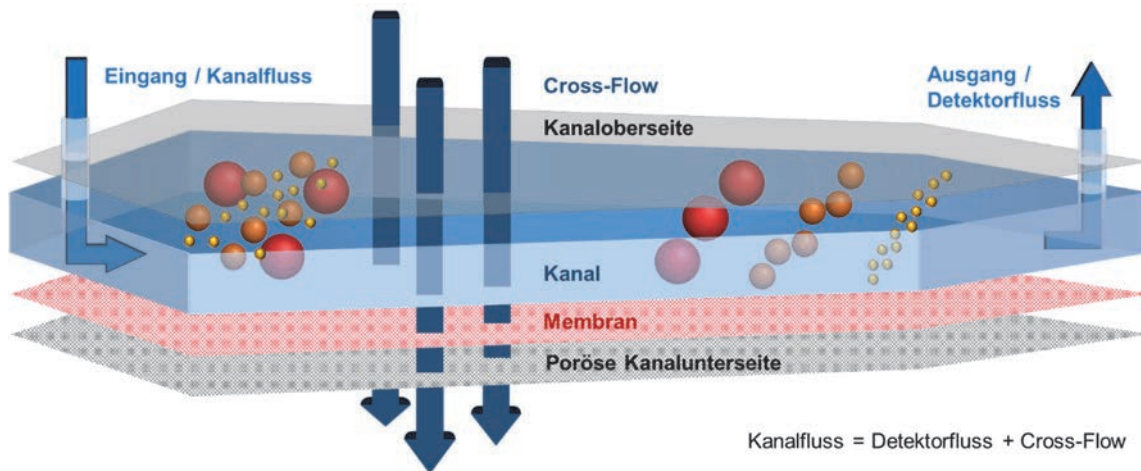


Abbildung 6: Schematischer Querschnitt durch einen AF4-Kanal, der das Trennprinzip verdeutlicht. Nach der Elution kann eine Detektion über verschiedene Detektorsysteme erfolgen.

Die Trennung in der AF4 erfolgt in einem zumeist trapezförmigen Kanal, dessen feste Ober- und poröse Unterseite durch einen Spacer voneinander getrennt sind. Die Probe wird über einen Eingang dem Kanal zugeführt und durch den angelegten Detektorfluss in Richtung des Ausgangs transportiert. Durch Anlegen eines senkrechten Flussfeldes – dem sogenannten Cross-Flow – kommt es zu einer Bewegung der Partikel in Richtung einer Membran mit definierter Porengröße auf dem Kanalboden. Sie ermöglicht eine Akkumulation der Partikel, während ein Teil des Fließmittels abtransportiert werden kann. Durch den sich bildenden Konzentrationsgradienten sind die Partikel nun bestrebt, sich über Diffusion in die entgegengesetzte Richtung – in Richtung der Kanalmitte – zu bewegen. Die Überlappung beider Bewegungen / Kräfte ist abhängig vom Diffusionskoeffizienten des jeweiligen Teilchens, der wiederum direkt mit dem hydrodynamischen Durchmesser zusammenhängt, und resultiert in einer spezifischen Position innerhalb des parabolischen Strömungsprofils. Kleinere Partikel lokalisieren sich weiter von der Membran entfernt und besitzen dadurch eine erhöhte Fließgeschwindigkeit. Sie eluieren vor den größeren Teilchen. Einen Sonderfall stellt dabei der sogenannte sterische Modus dar, bei dem die Auftrennung genau entgegengesetzt erfolgt. Dieser tritt auf, wenn die Größe der aufzutrennenden Partikel einen kritischen Wert überschreitet, üblicherweise 1 µm.

In der Regel ist der Auftrennung ein Fokusschritt vorgeschaltet. Hierfür wird ein Fokusfluss angewendet, der dem Detektorfluss entgegenwirkt und eine Bewegung der Partikel entlang des Kanals verhindert. Durch gleichzeitiges Anlegen eines Cross-Flows ist dadurch eine Aufkonzentration der Probe und Vortrennung in der Nähe des Injektionsortes möglich, wodurch die Auflösung verbessert werden kann.

Durch Regulierung des Cross-Flows, Detektor- und Fokusflusses, Einsatz eines Cross-Flow-Gradienten, Variation der Membran und anderer Parameter ist es möglich, auch komplexe Proben anhand ihrer Größe aufzutrennen. Im Anschluss an die Elution kann eine

Charakterisierung on-line über verschiedene Detektoren erfolgen. In der Literatur werden dabei klassischerweise Brechungsindex-, UV/Vis-, Fluoreszenz sowie Lichtstreuendetektoren verwendet. Durch anschließende Fraktionierung sind allerdings auch off-line Verfahren, wie beispielsweise Massenspektrometrie oder Elektrophorese möglich. Durch Verwendung eines größeren Kanals kann diese Methode auch zur präparativen Aufreinigung verwendet werden.

Als Vorteile der AF4 werden die vergleichsweise kurze Trennzeit, die hohe Variabilität der Parameter sowie das Fehlen einer stationären Phase genannt, wodurch geringere Wechselwirkungen auftreten. Durch die Auftrennung in verschiedene Fraktionen ist sie einzelnen Bulkverfahren bei der Analyse komplexer Proben überlegen. Als nachteilig haben sich in der Literatur vor allem die hohe Verdünnung und daraus resultierende Auswaschphänomene bei der Trennung sowie Absorptionserscheinungen an der Membran herausgestellt (Wagner et al. 2014).

Die AF4 wurde in zahlreichen Arbeiten zur Charakterisierung von polydispersen Nanosystemen verwendet. Ein Hauptaugenmerk lag dabei auf der Auftrennung von Proteinen, im Speziellen von Plasmaproteinen, Plasmaproteinfractionen oder dem kompletten Humanplasma. So wird an verschiedenen Stellen die schnelle und gut auflösende Fraktionierung von Plasma beschrieben (Qureshi et al. 2009, Lee et al. 2011), die bereits zur Bestimmung des Bindungsverhaltens eines Wirkstoffes an Plasmaproteine verwendet wurde (Madorin et al. 1997).

Auch auf dem Gebiet der Liposomen fand die AF4 bereits breite Anwendung. Neben umfangreichen Arbeiten, die sich mit der Eignung der Methode zur Charakterisierung von Liposomen befassten und dabei auf die unterschiedlichen Fraktionierungsparameter eingingen (Hupfeld et al. 2009a, Hupfeld et al. 2009b, Kuntsche et al. 2012), beschäftigten sich Decker et al. mit dem größenabhängigen Verteilungsverhalten von Cholesterol und mTHPC in rigide und fluide Membranen. Hieraus berechneten sie im Anschluss den Einfluss beider Moleküle auf die Membransteifigkeit. Die erzielten Ergebnisse für die fluiden Liposomen aus POPC/POPG zeigten, dass Cholesterol die Membran rigider macht, während für mTHPC der gegenteilige Effekt beobachtet werden konnte (Decker et al. 2012). Zuletzt konnten Hinna et al. die AF4 dazu benutzen, um zwei unterschiedlich große Liposomenpopulationen voneinander zu trennen. Auf diese Weise waren sie in der Lage, den Transfer der lipophilen Modellschubstanz pTHPP aus kleinen Donoren an große Akzeptoren on-line mittels eines UV/Vis-Detektors zu bestimmen (Hinna et al. 2014).

1.4.5 Langmuir-Filmwaage

Ende des 19. Jahrhunderts entdeckte die Braunschweigerin Agnes Pockels bei Untersuchungen in ihrem heimischen Waschbecken den Effekt von Verunreinigungen auf die Eigenschaften der Wasseroberfläche. In der Folge entwickelte sie 1882 eine Apparatur, mit der es möglich war, über Schienen eine reine Wasseroberfläche beliebig zu vergrößern oder zu verkleinern, um anhand einer Waage Änderungen ihrer Oberflächenspannung aufzunehmen. Die Ergebnisse ihrer Untersuchungen stellte sie über Umwege im Jahr 1891 in *Nature* vor, nachdem sie dem Physiker Lord Rayleigh, der sich ebenfalls mit diesem Phänomen beschäftigte, einen Brief schrieb (Beisswanger 1991). Irving Langmuir befasste sich Anfang des 20. Jahrhunderts intensiv mit Untersuchungen an Lipidmonoschichten, die auf eine wässrige Phase aufgetragen wurden. Er beschrieb, dass die Moleküle in dieser Monoschicht eine bevorzugte Orientierung aufweisen, die abhängig von der Oberflächenspannung ist. Ebenso gelang es ihm mit seiner Assistentin Katherine Blodgett, Monolayer auf einem festen Substrat zu schichten. Für seine Arbeit im Bereich der Oberflächenchemie erhielt er 1932 den Nobelpreis (Biolin Scientific 2016). Ein schematischer Aufbau einer Langmuir-Filmwaage, wie sie heute verwendet wird, ist in Abbildung 7 abgebildet.

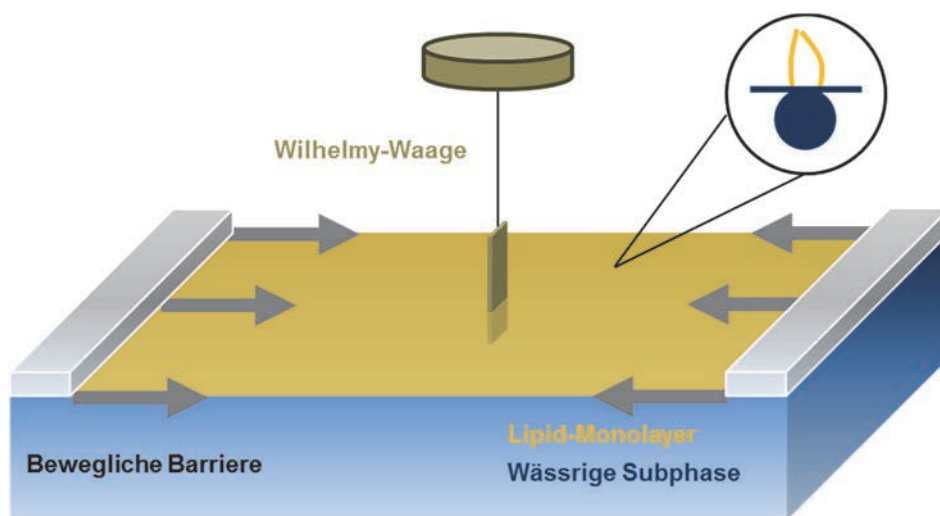


Abbildung 7: Schematischer Aufbau einer Langmuir-Filmwaage, in der ein Phospholipid-Monolayer auf einer wässrigen Phase aufgetragen wurde. Über bewegliche Barrieren lässt sich der Film komprimieren oder expandieren. Die Messung der Oberflächenspannung erfolgt mithilfe einer Wilhelmy-Waage (z.B. Filterpapier).

Auf die Oberfläche einer wässrigen Phase (Subphase) wird ein Film nicht wasserlöslicher Moleküle – z.B. Öl – oder oberflächenaktiver Substanzen – z.B. Phospholipide – unterhalb ihrer kritischen Mizellbildungskonzentration aufgetragen. Dieser Film wird als Monoschicht bzw. Monolayer bezeichnet. Durch Vergrößerung oder Verkleinerung der Oberfläche – z.B. durch Barrieren, die auf der Subphase aufliegen – bei einer konstanten Anzahl an Molekülen, die sich im Monolayer befinden, verändert sich die Oberflächenspannung. Bei einer Komprimierung sinkt sie. Die Oberflächenspannung wird über eine Wilhelmy-Waage gemessen. Ein Beispiel für eine solche Waage ist ein Filterpapier, das in Kontakt mit der

wässrigen Phase steht. Dieses Filterpapier wird durch eine Flüssigkeitslamelle benetzt und nach unten gezogen. Es wird die Kraft gemessen, die notwendig ist, um dies auszugleichen. Dieser Effekt ist abhängig von der Oberflächenspannung. Mit sinkender Oberflächenspannung steigt die Adhäsion der Flüssigkeit am Filterpapier. Folglich muss eine höhere Kraft aufgewendet werden.

Üblicherweise wird der Lateraldruck π angegeben, der sich aus der Differenz der Oberflächenspannung von Wasser (72 mN/m bei 25°C (Vargaftik et al. 1983)) und der gemessenen Oberflächenspannung des Systems berechnet. Mit sinkender Oberflächenspannung (z.B. bei der Komprimierung des Films) steigt also π .

Diagramme, die die Abhängigkeit von π von der Fläche darstellen, werden als Isothermen bezeichnet. Eine solche Isotherme ist in Abbildung 8 schematisch für einen Phospholipid-Monolayer dargestellt. Üblicherweise werden die Flächen pro Molekül angegeben (Moghaddam et al. 2011).

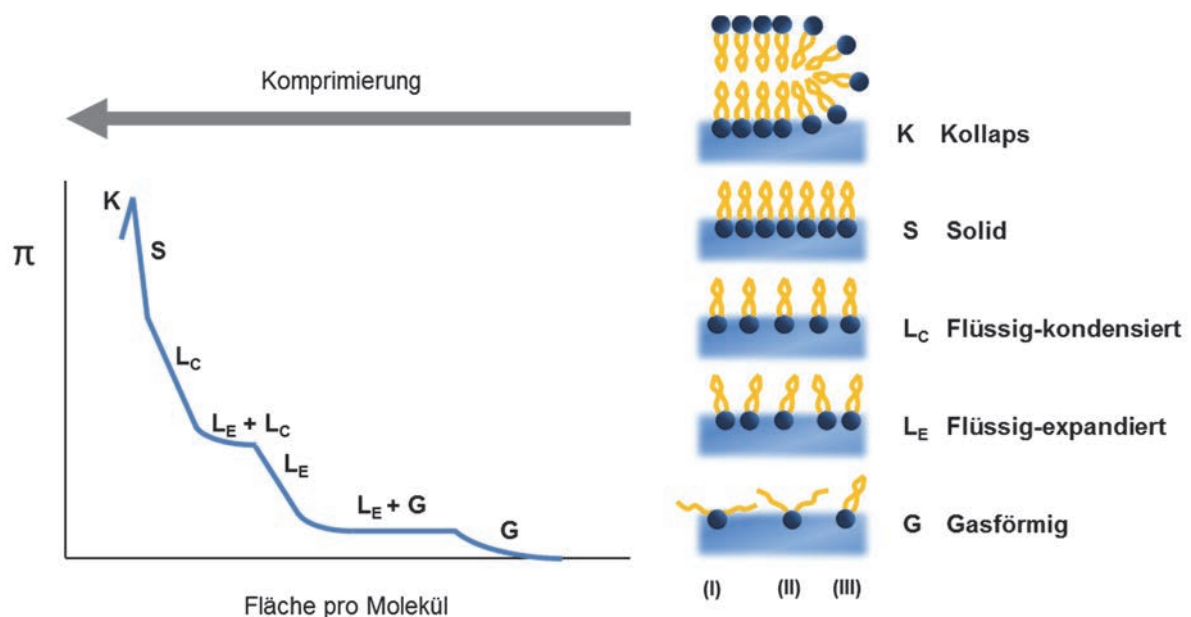


Abbildung 8: Beispiel einer π -A-Isotherme eines Phospholipidmonolayers sowie die einzelnen Zustände / Phasen, die er während der Kompression besitzen kann. Auf der rechten Seite ist die Packung der Lipide in den einzelnen Phasen schematisch dargestellt. Abbildung modifiziert nach Moghaddam et al. (Moghaddam et al. 2011).

Die Orientierung der lipophilen Ketten ist dabei abhängig von dem ihnen zur Verfügung stehenden Platz. Durch stetige Komprimierung und Verringerung des Platzangebotes erhöht sich die Interaktion zwischen den Molekülen, wodurch es zu einem Anstieg von π kommt. Dabei durchläuft das Phospholipidmolekül verschiedene Phasen, die in Abbildung 8 skizziert sind. Welche Phasen ein Phospholipid bei der Verringerung der Fläche durchläuft, hängt von seinen Eigenschaften (z.B. Kettenlänge, Doppelbindungen u.a.) ab. Nehmen die Moleküle ihren minimalen Platzbedarf ein, kollabiert der Film bei weiterer Komprimierung (Moghaddam et al. 2011).

Trotz dieses vergleichsweise einfachen Aufbaus, konnten Untersuchungen am Monolayer genutzt werden, um das Verhalten von Phospholipiden (Yun 2003, Ma und Allen 2006) sowie den Einfluss eines Wirkstoffes zu auf diese zu studieren (Geraldo et al. 2013). Ferner beschreiben verschiedene Studien Transferversuche aus der Subphase (Seelig 1987) oder zwischen Modellmembranen (Leonard-Latour et al. 1997) oder die Simulation ganzer Zellsysteme (Caseli et al. 2012).

Eine umfangreiche Musterarbeit auf diesem Gebiet lieferten Fahr und Reiter, die sich mit der Fähigkeit eines Phospholipidfilms beschäftigten, Cyclosporin A aufzunehmen. Dabei nahmen sie Isothermen von unterschiedlichen Cyclosporin A/DOPC-Mischungen auf, um daraus Aussagen über den Platzbedarf und die Lage des Wirkstoffes im Monolayer zu treffen. In weiteren Versuchen bestimmten sie die Fähigkeit des Monolayers, in Abhängigkeit des konstant gehaltenen Lateraldrucks freies Cyclosporin A, das in die Subphase injiziert wurde, aufzunehmen. Abschließend untersuchten sie die Transfereigenschaften von liposomalem Cyclosporin A an den Monolayer (Fahr und Reiter 1999).

Moghaddam et al. untersuchten in ihrer Arbeit den Effekt von Cholesterol und Fettalkoholen auf die Lipidpackung eines Monolayers. Sie konnten zeigen, dass Cholesterol und Tetradecanol mit DSPC interagieren und den Film kondensieren, wobei der Effekt für Cholesterol stärker ausgeprägt war. Sie verglichen auch die Isothermen von DMPC, DPPC und DSPC und schlussfolgerten, dass unter diesen Lipiden DMPC, das den geringsten Kollapsdruck aufwies, Liposomen mit der geringsten Stabilität ausbildet. Ferner konnten sie zeigen, dass DSPC aufgrund der längeren Fettsäureketten und höherer Van-der-Waals-Kräfte die am dichtesten gepackten Monoschichten ausbildet (Moghaddam et al. 2011).

1.5 Problem- und Zielstellung der Arbeit

Ein grundlegendes Verständnis eines komplexen Arzneistoffträgersystems ist für dessen *in vivo*-Anwendung essentiell und in gewissen Aspekten bereits behördlich gefordert. *In vitro*-Modelle bilden in diesem Kontext eine wichtige Stütze, mit deren Hilfe verschiedenste Mechanismen auf pharmakodynamischer oder –kinetischer Ebene erklärt werden können.

Die vorab vorgestellten *in vitro*-Methoden stellen nur einen Ausschnitt des Spektrums dar, welches heute zur Abschätzung und dem Verständnis der *in vivo*-Pharmakokinetik von Liposomen zur Verfügung steht. Darüber hinaus besitzt jede Methode ihre individuellen Vor- und Nachteile sowie Limitationen, sodass die Auswahl entsprechend den jeweiligen Untersuchungszielen getroffen werden sollte.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich unter dem Titel „Studien zur Beladungskapazität kolloidaler Formulierungen“ mit der Frage, inwiefern Liposomen – als ein prominentes Beispiel für ein kolloidales Arzneistoffträgersystem – eine Option darstellen, ausgewählte lipophile Wirkstoffe dem Körper systemisch zur Verfügung zu stellen. Neben der Möglichkeit, diese Wirkstoffe in einen liposomalen Bilayer einzubauen, sollen darüber hinaus die Fähigkeit der Membran untersucht werden, diesen Wirkstoff in Gegenwart eines lipophilen Akzeptors – z.B. einer einschichtigen Modellmembran oder Plasmabestandteilen – in der Membran zu halten. Das Zusammenspiel dieser beiden Eigenschaften soll repräsentativ für die „Beladungskapazität“ stehen und für die jeweiligen Formulierungen betrachtet werden.

Diese Überlegungen zusammenfassend ergaben sich für die vorliegende Arbeit folgende Zielstellungen:

- (1) Es sollten liposomale Formulierungen für verschiedene lipophile Wirkstoffe entwickelt werden. Die APIs unterschieden sich dabei hinsichtlich ihrer Lipophilie, Molekülgröße und weiteren physikochemischen Parametern.
- (2) Im weiteren Verlauf sollte das Transferverhalten der Wirkstoffe aus dem Bilayer an lipophile Akzeptoren untersucht werden. Den Schwerpunkt bildeten dabei Interaktionen mit Plasmaproteinen, wobei auch die Vesikelstabilität untersucht werden sollte. An der AF4 – als ein in diesem Feld neues System – sollte eine Separationsmethode entwickelt werden, mit deren Hilfe entsprechende Inkubationsversuche analysiert werden konnten.
- (3) Im Folgenden sollten für den lipophilen Photosensitizer Temoporfin als Modellsubstanz Parameter der Formulierungsentwicklung – im Speziellen die Membranzusammensetzung – identifiziert werden, die Einflüsse auf die *in vitro*-Pharmakokinetik von mTHPC-Liposomen haben.
- (4) Unterstützende Messungen an geeigneten Systemen – z.B. dem Langmuir-Trog – sollten dazu beitragen, die getätigten Beobachtungen aus (3) besser interpretieren zu können.
- (5) Die Transfereigenschaften der weiteren lipophilen liposomalen Wirkstoffe aus (1) sollte mithilfe der entwickelten Methoden bestimmt und im Gesamtkontext betrachtet werden.

2 Veröffentlichungen

2.1 Übersicht zu den Veröffentlichungen

2.1.1 Veröffentlichung 1

Asymmetrical Flow Field-Flow Fractionation in the Field of Nanomedicine

Michael Wagner, Stephan Holzschuh, Anja Träger, Alfred Fahr, Ulrich S. Schubert

Publiziert in *Analytical Chemistry*, akzeptiert am 06. Mai 2014

Inhaltsangabe:

Der Perspective beschreibt die grundlegende Funktionsweise der AF4 und ihre Vor- und Nachteile gegenüber alternativen Messmethoden, beispielsweise DLS, Mikroskopie oder SEC. Anhand einer einfachen liposomalen Formulierung wird der Einfluss verschiedener Trennparameter auf die erzielte Trennleistung beschrieben. Ferner werden im Hauptteil mithilfe aktueller Literatur die vielfältigen Möglichkeiten des Einsatzes dieser Methode zur Charakterisierung von Nanosystemen auf dem Gebiet der Arzneimittelentwicklung erläutert. Das Portfolio reicht dabei von Größen- und Größenverteilungsstudien unterschiedlichster disperser Systeme und Freisetzungsuntersuchungen aus Nanoträgern hin zu Bindungsstudien an Plasmaproteine oder rein präparativer Auftrennung und off-line Charakterisierung von kolloidalen Gemischen. In einer Übersichtstabelle werden die vorhandenen, auf diesem Gebiet publizierten Studien ($n > 200$) anhand der Art der Probe, dem Ziel der Messung, den verwendeten Diluenten, Membranen und nachgeschalteten Detektionssystemen zusammengefasst und geben dem Leser einen detaillierten Überblick über die verschiedenen Problemstellung und Lösungsansätze.

Eigenanteil:

- Durchführung der praktischen Arbeiten (100 %)
- Erstellung des Manuskripts (ca. 25 %)
Kapitel „Liposomes“ und „Proteins und Viruses“

2.1.2 Veröffentlichung 2

Quantitative *In Vitro* Assessment of Liposome Stability and Drug Transfer Employing Asymmetrical Flow Field-Flow Fractionation (AF4)

Stephan Holzschuh, Kathrin Kaeß, Alfred Fahr, Christiane Decker

Publiziert in *Pharmaceutical Research*, akzeptiert am 16. November 2015

Inhaltsangabe:

In dieser Arbeit wurde erstmals die Eignung der AF4 zur Auftrennung von Liposomen und Plasmaproteinen gezeigt. Die entwickelte Methode war dabei schnell und zeigte eine sehr gute Trennung der wichtigen Fraktionen (Albumin, HDL, LDL und Liposomen). Auf diese Weise konnte die Stabilität einer in humanem Plasma inkubierten Formulierung in Abhängigkeit von ihrer Zusammensetzung untersucht werden. Zur Beurteilung wurden radioaktive Label – COE und DPPC – verwendet. Dabei konnte festgestellt werden, dass Ersterer aktiv durch ein Transferprotein (CETP) ausgetauscht wird. Die Geschwindigkeit dieses Austausches ist abhängig von der Rigidität der Membran und der Oberflächenmodifikation (z.B. PEG). Wurde die Probe mit dem CETP-Inhibitor Torcetrapib präinkubiert, konnte dieser Austausch auf ein Minimum begrenzt werden. DPPC-Label sind keine Substrate des CETP, neigten allerdings zur lagerungsabhängigen Hydrolyse. Die zeitabhängige Verteilung eines DPPC-Labels in der gleichen Formulierung war davon abhängig, ob das Phospholipid an einer Fettsäure oder der Cholingruppe gelabelt wurde, da eine freie Fettsäure verstärkt an Albumin bindet, wohingegen ein Lysolipid lipophilere Strukturen bevorzugt. Die rigide DPPC/DPPG-Formulierung war stabiler als die fluiden EPC/EPG-Liposomen. PEGylierung der Oberfläche konnte die Stabilität der Vesikel in Plasma zusätzlich erhöhen. Dennoch setzten die rigiden Liposomen trotz erhöhter Stabilität den in den Bilayer eingebauten und ebenfalls radioaktiv markierten Wirkstoff mTHPC schneller frei als es aus einer fluiden Membran geschah.

Eigenanteil:

- Versuchsplanung und –vorbereitung (ca. 75 %)
- Durchführung der praktischen Arbeiten (ca. 90 %)
Herstellung und Charakterisierung der Liposomen, Durchführung der Inkubationsversuche
- Versuchsauswertung (ca. 90 %)
- Erstellung und Korrektur des Manuskripts (ca. 70 %)

2.1.3 Veröffentlichung 3

Investigations of the influence of liposome composition on vesicle stability and drug transfer in human plasma: A transfer study

Stephan Holzschuh, Kathrin Kaeß, Guilherme Volpe Bossa, Christiane Decker, Alfred Fahr, Sylvio May

Publiziert in *Journal of Liposome Research*, akzeptiert am 07.10.2016

Inhaltsangabe:

Verschiedene Parameter einer liposomalen Formulierung haben einen Einfluss auf das in vitro-Verhalten in humanem Plasma. Die Studie untersucht systematisch den Einfluss der Membranzusammensetzung (Phospholipidzusammensetzung, Cholesterol, PEGylierung und Wirkstoffbeladung) auf die Vesikelstabilität und Wirkstofffreisetzung von Temoporfin-Liposomen. Proben wurden in humanem Plasma inkubiert und anschließend mithilfe der AF4 aufgetrennt. Die Inkubationszeiten variierten zwischen 0,5 und 120 Stunden. Die relative Wirkstofffreisetzung nahm mit der Rigidität der Membran zu und wurde ebenfalls durch den Einbau von Cholesterol sowie eine höhere Wirkstoffbeladung begünstigt. Rigide Membranen und der Zusatz von Cholesterol erhöhten gleichzeitig die Stabilität der Formulierung. Dies konnte ebenso durch eine PEGylierung der Oberfläche erreicht werden. Der Photosensitizer lag nach Freisetzung vor allem an den Lipoproteinen HDL und LDL gebunden vor. Die zeitabhängige Verteilung wurde mithilfe eines mathematischen Modells analysiert, anhand dessen mögliche Freisetzungsmechanismen diskutiert wurden.

Eigenanteil:

- Versuchsplanung und –vorbereitung (ca. 50 %)
- Durchführung der praktischen Arbeiten (ca. 80 %)
Herstellung und Charakterisierung der Liposomen, Durchführung der Inkubationsversuche
- Versuchsauswertung (ca. 90 %)
- Erstellung und Korrektur des Manuskripts (ca. 75 %)

2.2 Veröffentlichung 1

Asymmetric flow field-flow fractionation in the field of nanomedicine.

Michael Wagner, Stephan Holzschuh, Anja Träger, Alfred Fahr, Ulrich S. Schubert;

Publiziert in: Analytical Chemistry
Akzeptiert: 06. Mai 2014
Online: 06. Mai 2014
DOI: 10.1021/ac501664t.
Printversion: Juni 2014, Volume 86, Issue 11, S. 5201-10.

Reprinted with permission from Anal. Chem. 2014, 86, 5201-5210. Copyright 2014 American Chemical Society.

Publication is available at <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac501664t>.

Asymmetric Flow Field-Flow Fractionation in the Field of Nanomedicine

Michael Wagner,^{†,‡} Stephan Holzschuh,[§] Anja Traeger,^{†,‡} Alfred Fahr,^{‡,§} and Ulrich. S. Schubert^{*,†,‡}

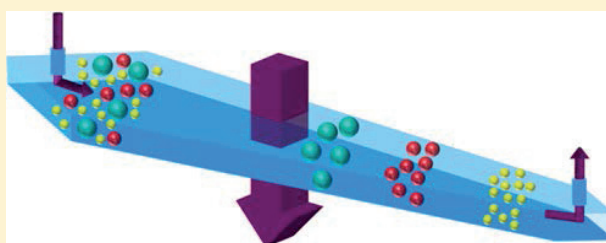
[†]Laboratory of Organic and Macromolecular Chemistry (IOMC), Friedrich Schiller University Jena, Humboldtstrasse 10, 07743 Jena, Germany

[‡]Jena Center for Soft Matter (JCSM), Friedrich Schiller University Jena, Philosophenweg 7, 07743 Jena, Germany

[§]Department of Pharmaceutical Technology, Friedrich Schiller University Jena, Lessingstrasse 8, 07743 Jena, Germany

Supporting Information

ABSTRACT: Asymmetric flow field-flow fractionation (AF4) is a widely used and versatile technique in the family of field-flow fractionations, indicated by a rapidly increasing number of publications. It represents a gentle separation and characterization method, where nonspecific interactions are reduced to a minimum, allows a broad separation range from several nano- up to micrometers and enables a superior characterization of homo- and heterogenic systems. In particular, coupling to multiangle light scattering provides detailed access to sample properties. Information about molar mass, polydispersity, size, shape/conformation, or density can be obtained nearly independent of the used material. In this Perspective, the application and progress of AF4 for (bio)macromolecules and colloids, relevant for “nano” medical and pharmaceutical issues, will be presented. The characterization of different nanosized drug or gene delivery systems, e.g., polymers, nanoparticles, micelles, dendrimers, liposomes, polyplexes, and virus-like-particles (VLP), as well as therapeutic relevant proteins, antibodies, and nanoparticles for diagnostic usage will be discussed. Thereby, the variety of obtained information, the advantages and pitfalls of this emerging technique will be highlighted. Additionally, the influence of different fractionation parameters in the separation process is discussed in detail. Moreover, a comprehensive overview is given, concerning the investigated samples, fractionation parameters as membrane types and buffers used as well as the chosen detectors and the corresponding references. The perspective ends up with an outlook to the future.



Nowadays, the understanding and development of nanomedicines like biopharmaceuticals or nanoparticles for drug and gene delivery requires the improvement of analytical characterization methods.^{1–3} Moreover, the effects of drugs in the human body are complex, and it is essential to understand the fate of a drug as well as its mode of action. To investigate these effects, methods are required for separating and analyzing single components from complex biological samples. The increasing importance for separation techniques of suspended analytes (particular or macromolecular form) in all fields of life sciences was one of the key factors for the success of field-flow fractionation (FFF) in the last years. Invented by J. C. Giddings in 1966, field-flow fractionation comprises a class of fractionation techniques, based on a flat channel, where a separation field, perpendicular to the direction of the sample flow is applied.⁴

In asymmetric flow FFF (AF4), the separation is achieved by a liquid cross-flow which takes place in a narrow, ribbon-like channel of trapezoidal geometry, which is built up by a spacer, between a porous and a nonporous plate (Figure 1). The porous plate is covered by a membrane, which acts as accumulation wall and allows the eluent to pass the membrane, while the particles/macromolecules are retained. The first AF4

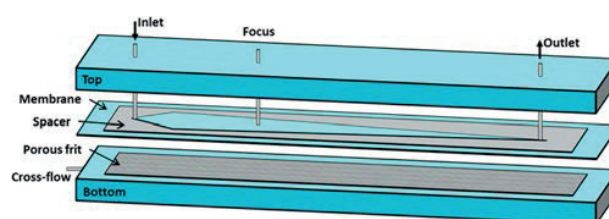


Figure 1. Schematic representation of an AF4 channel. The eluent is pumped from the inlet to the outlet. The membrane acts as accumulation wall and represents the porous wall. The geometry of the channel is defined by the spacer.

system was presented in 1987 by Giddings and Wahlund.⁵ Since 20 years, it is the most used and versatile technique in the family of FFF and has nearly replaced the symmetric version, indicated by the rapidly increasing number of publications.^{5,6}

During the transport of the analyte by the eluent, the application of the cross-flow results in a force, dragging the

Received: February 19, 2014

Accepted: May 6, 2014

Published: May 6, 2014

particles/macromolecules to the surface of the membrane (Figure 2). Because of the formed concentration gradient, the

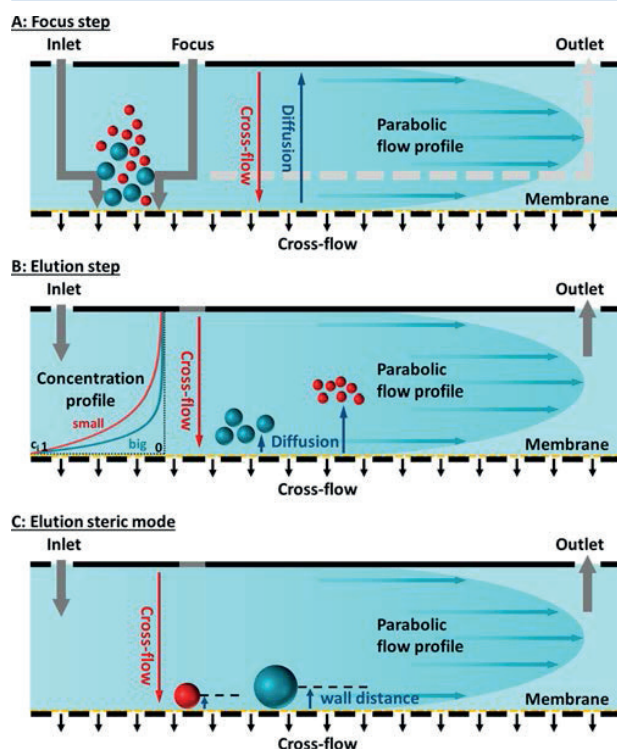


Figure 2. Schematic representation of the AF4 principle. The eluent is pumped from the inlet to the outlet, and the cross-flow is applied perpendicular to the flow direction. The different steps are (A) the focusing process (stopped flow) and (B) the elution process under normal mode; part C shows elution under steric conditions.

diffusivity acts as a counteracting force, until an exponential steady-state-distribution of the analyte with the highest concentration at the wall is reached (Fick's law).⁵ According to the individual diffusion coefficient of each particle, the concentration profile is extended more or less into the channel and different streamlines of the parabolic velocity flow profile were occupied (Figure 2B, schematic concentration profiles, left). With decreasing size/increasing diffusion coefficient of the particles or macromolecules, the concentration profile is more extended into the channel resulting in a higher average (characteristic) distance from the wall (visualized by the particles in Figure 2B) and faster elution. It has to be kept in mind, that even for small particles, the highest concentration is reached near the wall and that Figure 2 is an exaggerated schematic visualization. Furthermore, in the beginning of a measurement, an additional focusing/relaxation procedure is normally applied to concentrate the analyte in a narrow zone and avoid spreading over the whole channel length during injection (Figure 2A). If the size of the analyte exceeds a certain limit (usually $>1\ \mu\text{m}$), the retention behavior changes from the normal, also termed Brownian mode, to the steric mode (steric FFF). In steric FFF, the sample is located in a thin layer very close to the wall and the order of retention changes in a way that larger particles/macromolecules elute first (Figure 2C). As most types of therapeutics as discussed in this Perspective are below this size limit, the reader is referred to literature for further details.^{7,8} The theoretical basis of FFF was developed in

detail by Giddings, Wahlund, and co-workers.^{5,9–11} For an extensive theoretical description and detailed insights, the reader is referred to cited literature or the comprehensive "Field-Flow Fractionation Handbook".¹²

As many modern medicines and diagnostics are based on colloidal/macromolecular matter like proteins/antibodies, viruses, liposomes, quantum dots (QD), nanoparticles, as well as other polymeric drug and gene delivery systems, AF4 enables a certain progress in the understanding of such systems. Nowadays, AF4 coupled to different detectors allows the acquisition of key parameters, e.g., molar mass, size, density, diffusivity, surface, aggregation, conformation, or shape.¹³ In the past, a RI or UV detector was attached to FFF and the hydrodynamic radius as well as the molar mass was obtained by a calibration with standards or applying FFF theory. As nonideal effects, like membrane interactions or self-interaction of the sample, lead to deviations from the theoretical approach,¹⁴ FFF was limited to a few applications. In 1984, M. Martin reported the first coupling of an online light scattering detector.¹⁵ As it was now possible to obtain independent information about size and molar mass, greater attention was paid to these techniques.¹⁶ Nowadays, a multiangle laser light scattering (MALLS) or dynamic light scattering (DLS) detector is commonly used for the analysis during the fractionation process.^{17,18} In contrast to traditional batch DLS or SLS, the prior fractionation by AF4 allows the investigation of complex heterogeneous and polydisperse mixtures. As the intensity of scattered light scales with r^6 , smaller analytes are mostly discriminated in batch light scattering, if larger populations as aggregates are present in solution. This often results in misleading distributions or averages and prohibits quantification of single populations. This can be circumvented by the prior fractionation by AF4. The biggest drawback of light scattering based detectors is their limited application for small particles/macromolecules. For MALLS, a radius of gyration of at least 10 nm is necessary due to the uniform scattering of small particles. In general, a MALLS detector ranges from around 10^4 to $10^9\ \text{g mol}^{-1}$ or from around 10 to 1000 nm radius, depending on the refractive index increment ($\partial n/\partial c$) and the number of angles where the intensity of the scattered light is measured. Because of the fact that the intensity of scattered light scales with r^6 , high concentration of small particles/macromolecules have to be injected, which can lead to separation problems or particle–membrane interactions. If the characterization is not adequate by the detection techniques mentioned above, other methods can easily be coupled online or offline to AF4 as far as the sample concentration is sufficiently high. This includes inductively coupled plasma mass spectrometry (ICPMS),^{19,20} laser-induced breakdown detection (LIBD),²¹ viscosimetry, infrared detection,²² nephelometric turbidity,²³ fluorescence spectroscopy, X-ray fluorescence analysis (XFA),²⁴ nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR), small-angle X-ray scattering (SAXS),^{25,26} electron microscopy, light microscopy, as well as different variations of mass spectrometry.²⁷

Beside the simple hyphenation to other methods, further advantages are the automation, the low measurement time, the easy collection of fractions, and primarily the absence of a package material or a stationary phase.²⁸ In classic chromatography techniques, such as, e.g., size exclusion chromatography (SEC), strong forces can act between the stationary phase and the sample, which can result in considerable (shear) degradation, irreversible adsorption, coelution, or denaturation

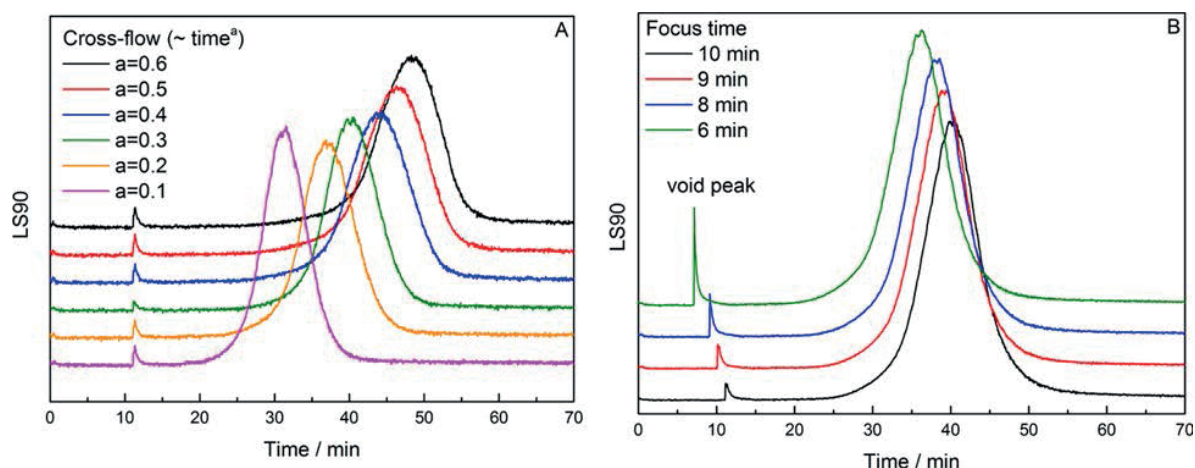


Figure 3. Influence of AF4 parameters on the retention of liposomes. Fractogram of mTHPC containing POPC liposomes at (A) different cross-flow rates (power function gradient with different exponents a) and (B) different focusing time (the difference in elution time corresponds to the different focusing times). Detector flow 1.2 mL/min, focus flow 3 mL/min for all samples, 500 μ m spacer. The initial cross-flow was set to 2 mL/min and reduced with a power function gradient within 60 min to zero. Afterward cross-flow was kept constant at 0 mL/min to ensure complete elution ($a = 0.3$ for part B). For varying cross-flow exponents, the focusing time was set to 10 min.

of the investigated analyte.²⁹ In contrast, in an empty channel the applied flow is less tortuous, resulting in lower shear forces and a very gentle separation method, applicable to very delicate samples of biological origin like proteins or nucleic acids.³⁰ In addition, the capability of AF4 enhances with increasing molar mass without the limitation of an exclusion limit as for SEC.³¹ A wide range of solvents or buffers can be applied, fractionation can be performed at different temperatures, and even complex, broadly dispersed multicomponent samples can be analyzed without extensive sample preparation. The possibility to alter the flow rates quickly and precisely, and thereby to control the retention behavior, enables the individual tuning for optimal separation and resolution of each sample. Unfortunately, this exceptional flexibility of AF4 is also one of the most important drawbacks as eluent, flow conditions, and single parameters have to be optimized for each sample. Up until now, this lessens the advantage in time and prevents AF4 from being applied routinely as a standard method. As it can be very difficult to find a suitable set of parameters for fractionation, a list of pharmaceutical relevant samples analyzed in the literature is presented in Tables 1–4 (Supporting Information), listing the used membrane, eluent, and detection method (as described in the respective publication) with short comments and the corresponding references.

ON THE ROAD TO THE RIGHT CONDITIONS

One advantage of AF4 is the use of an empty channel without a stationary phase, which minimizes shear induced degradation and reduces interactions with the sample in contrast to SEC. Nevertheless, there are interactions, mainly with the membrane. As the sample is mostly located at the membrane surface during separation, adsorption can become a massive problem in AF4. Therefore, the choice of an appropriate membrane material and eluent is crucial and often time-consuming. Various membrane materials are available, e.g., regenerated cellulose (RC), cellulose triacetate (CTA), poly(ether sulfone) (PES), polypropylene (PP), polyamide (PA), polycarbonate (PC), or polyvinylidene difluoride (PVDF), differing in their thickness, surface, surface charge, smoothness, and mechanical as well as chemical stability. The eluent and the sample have to be

compatible with the membrane to reduce adsorption effects. If interactions with the membrane cannot be avoided or lead to massive adsorption and sample loss, the addition of a surfactant like Triton X-100, sodium dodecyl sulfate (SDS), cetyltrimethylammonium bromide (CTAB), or different polysorbates (Tween) could be beneficial.³² This effect is mainly based on membrane conditioning by binding of the surfactant on the membrane surface. If irreversible adsorption of a sample occurs, instead of the use of surfactants, a presaturation of the membrane can be achieved by injection of a small amount of sample on a fresh membrane. This conditioning leads to the formation of a monolayer of adsorbed sample on the membrane and a higher mostly constant recovery for further experiments with the same sample.^{28,33} Buffers to adjust the pH value or addition of salts to increase the ionic strength also influence the retention behavior and affect possible interactions, in particular when charged samples are investigated.^{34,35} This is due to electrostatic interactions between the analyte itself and between the analyte and the membrane.^{36–38} The chosen buffer and the resulting pH influence the net-charge of the sample material and the membrane by (de)protonation of basic or acidic groups. Hence, the attractive or repulsive electrostatic interactions are affected and elution times correlate well with the zeta potential of the sample.^{37,39} If membrane and sample are oppositely charged, attractive electrostatic interactions will occur, leading to late elution, immense adsorption effects, or aggregation. For a similarly charged membrane strong electrostatic repulsion occurs, which results in the movement of the analyte in a larger characteristic distance to the accumulation wall. Thus, faster streamlines are occupied by the sample, leading to a fast elution. The same repulsive electrostatic forces are present between the charged particles/macromolecules itself, inducing a high exclusion volume and a stretching of similar charged chains. Both influences the retention time and increases the effect of band broadening. An increase of the ionic strength by adding salts shields electrostatic forces and can help to reduce these effects.^{40,41} In contrast, if the ionic strength is high and electrostatic repulsion negligible, aggregation of the sample can occur due to dominating van-der-Waals forces. Furthermore, interactions between hydrophobic spots on the

membrane and hydrophobic domains of the sample (e.g., hydrophobic side chains or backbone) can occur. In particular, proteins are known to adsorb on surfaces when a pH near the isoelectric point (pI) of the protein is used, where no significant electrostatic force is present.⁴² All these adsorption effects disturb accurate quantification of analytes and render AF4 a more qualitative technique. Furthermore, salts as well as neutral excipients can have specific effects on the interactions taking place in the channel, e.g., complexation of cations by poly(ethylene glycol) (PEG) samples.^{43,44}

Besides, four flow rates have to be optimized for a standard AF4: the inlet flow rate, the focus flow rate, the cross-flow rate, and the detector/outlet flow rate. Most attention has to be paid on the choice of cross-flow and its scheduling, as it influences the distance between the sample and accumulation wall.³⁶ The general influence is represented in Figure 3A for *m*-tetrahydroxyphenylchlorin (mTHPC, temoporfin) containing 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (POPC) liposomes, showing that an increase of the cross-flow increases the retention time and enhances the fractionation. Anyhow, very high cross-flow rates could induce a sample loss by adsorption during the fractionation process, leading to lower mass recoveries.⁴⁵ In addition, the dilution of the sample, taking place due to the better fractionation, might be a problem as it decreases the signal-to-noise ratio during detection. In contrast, a very low cross-flow rate will result in a larger void peak and inadequate fractionation. An increase of cross-flow also leads to a higher concentration of the sample within the focus zone. This will increase the sample–sample interactions, which can result in aggregation or, in the case of polymers, entanglements of chains.⁴⁶ Beside the cross-flow, the focus flow (more precisely the ratio of inlet and focus flow) is highly important, as it is responsible for the formation of the focus zone and the steady-state distribution of the particles/macromolecules within. With increasing focus flow/decreasing inlet flow, the focus zone is located closer to the sample inlet. For adequate focusing, a certain focusing time is necessary.⁵ If the focusing time is too short, the sample is not relaxed and the steady-state distribution is not achieved. This can lead to peak broadening, inadequate fractionation, and an increase of the void peak. In contrast, a high focusing time increases the local concentration of the sample and its self-interactions as well as the interactions with the membrane. Additionally, for aggregation sensitive systems like antibodies or their conjugates, difficulties arise as they tend to show aggregation/self-association or deaggregation in dependence of the cross-flow and focus conditions.⁴⁷ In Figure 3B, the influence of the focusing time on the fractionation of mTHPC containing POPC liposomes is shown (compare ref 36 for DPPC/DPPG liposomes). It can be seen that with increasing focusing time, the void peak is reduced. Considering all nonideal aspects, the influence of the flow conditions has to be investigated and adapted individually for each sample to ensure a proper separation.⁴⁵

■ NANOMEDICINES IN THE CHANNEL

Synthetic Systems: Nanoparticles. Different types of nanoparticles (NP) are under investigation for manifold pharmaceutical applications.^{1,3,48,49} Novel polymeric nanoparticles or nanogels⁵⁰ were used for drug or gene delivery, i.e., incorporation of hydrophobic drugs. This encapsulation often improves the bioavailability, stability, and solubility of the drug. Furthermore, magnetic metal nanoparticles, quantum

dots, or the incorporation of dyes, contrast agents, or magnetic materials into polymer or silica particles provides access to nanosized diagnostic and imaging tools.^{51–53} For application of nanoparticles in a biological environment, precise knowledge regarding particle size, size distribution (polydispersity), particle density, surface, and particle shape is important as these key factors influence, among other things, biodistribution and the accumulation in tissues or the cellular uptake.^{54,55} Moreover, the particle size influences properties like the optical, electrical, or magnetic behavior of the nanoparticle itself (e.g., surface plasmon resonance).⁵⁶ AF4 offers the possibility to yield accurate size distributions at high resolution, without the problem of discriminating smaller particles as in batch DLS. If nanoparticles are present in a heterogeneous system containing, e.g., aggregates or other colloidal substances, AF4 enables the possibility to separate and characterize the individual components in a single experiment. In comparison with classical membrane separation techniques or preparative ultracentrifugation, this is advantageous in terms of time and resolution. As an illustrative example, Winter and co-workers investigated gelatin nanoparticles as a drug delivery agent loaded with an antibody fragment and a granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) as model protein drugs.⁵⁷ The preliminary characterization of the gelatin raw material confirms the advantage of AF4 to be a gentle separation technique.⁵⁸ In contrast to SEC, where raw gelatin with a molar mass of around 10^2 kg mol^{-1} was partially degraded due to high shear forces or elute close to the exclusion limit, it could be well characterized in a nondestructive way by AF4. After intensive optimization of the fractionation parameters, the AF4 study of the gelatin NPs reveals accurate information on size (150–300 nm) and polydispersity, whereas batch DLS suggested just a monodisperse sample.⁵⁷ Furthermore, AF4 enables the accurate determination of the loading (encapsulation) efficiency of drug carriers. If the drug itself is a macromolecule, e.g., a protein, it can be separated from the nanoparticles. The area under the curve (AUC) of the detector signal (RI/UV) of the unloaded protein enables the calculation of its concentration. In this context, AF4 is also usable to examine storage and time stability of nanoparticles, as changes in concentration, drug release, and size due to degradation or aggregation will be visible in the fractogram. Prerequisites for this method are baseline separation from the void peak, quantitative elution of the sample, and the absence of any adsorption phenomena. A similar issue belongs to the determination of the degree of surface modification, e.g., by grafting of polymers on nanoparticles or colloids. For example, the degree of PEGylation of nanostructures can be easily determined by direct fractionation of the reaction mixture (e.g., separating the residual PEG from the PEGylated nanoparticles) and subsequent integration of the UV/RI signal.⁵⁹ In the case of low molar mass drugs/dyes, the efficiency of drug loading cannot be determined directly as the unbound drug will not be retained by the membrane and the UV/RI signal of the encapsulated drug cannot be used. This is due to the dependence of the extinction coefficient on the molecular environment, which is, for example, different for the aqueous environment outside and the hydrophobic surrounding inside the nanoparticles.^{60,61} Up until now, two possibilities are known to address this problem. On the one hand, the maximal loading capacity can be accessed by AF4 analysis of a series of nanoparticles with varying amounts of a drug. Assuming that all drug is incorporated, the maximum number of drug molecules per nanoparticle can be calculated.⁶¹ On the

other hand, an additional UV detector can be coupled to the waste-line of the cross-flow outlet to quantify the amount of residual unbound drug, permeating through the membrane during the focusing period.⁶² Unfortunately, the establishment of such a method requires an intensive optimization procedure, to ensure that no free dye is adsorbed or retained on the membrane.⁶³ However, in our opinion AF4 represents a potential alternative to study also the encapsulation of low molar mass drugs into drug delivery systems.

Polymeric Self-Assemblies and Macromolecules. Similar to nanoparticles, defined polymer architectures or self-assembled structures of amphiphilic polymers can be used to encapsulate and deliver drugs or dyes. Manifold systems investigated by AF4 are known in literature, e.g., polymeric stars with varying number of arms and arm length,⁶⁴ dendrimers, micelles,⁶⁵ vesicles, or other morphologies formed by self-assembly of co- or terpolymers.^{66–68} Temperature responsive polymers, showing a lower critical solution temperature (LCST), were also investigated for drug delivery applications.⁶⁹ An illustrative and comprehensive example was given recently by Lederer et al., who investigated maltose decorated lysine-dendronized maleimide copolymers of different generations.⁶² The glycosylation by maltose increases the biocompatibility and allows active targeting of cells. A strong dependency of size and shape on pH, generation number, and concentration was found for the dendronized maleimide polymer due to the protonable amine groups. AF4 together with molecular dynamic simulations, AFM, and cryo-TEM could show that at low generation numbers coil-like structures were obtained, while worm-like structures were observed at higher generations. Information on the conformations/shape could either be obtained by AF4 and calculation of the shape ratio ρ (the ratio of the radius of gyration R_g and the hydrodynamic radius of the particle R_H) or application of scaling laws (eq 1) to the MALLS/DLS data of the fractionation.^{70–72} If the radius of gyration R_g (or R_H) is plotted against the molar mass M in a double logarithmic plot, the slope of the curve, ν , provides information about the conformation/shape of the macromolecule (K is a constant).

$$R_g = KM^\nu \quad (1)$$

An example is shown for generation zero of the maleimide copolymer in Figure 4. At pH 7 a slope of 0.67 is obtained, corresponding to a coil-like conformation, whereas a value of 0.25 at pH 11 correlates with dense and globular structures.⁷⁰ At pH 3.5, two conformations seem to be present, a low molar mass rod-like ($\nu = 0.98$) fraction and a dense, still anisotropic, high molar mass fraction ($\nu = 0.45$) (a sphere would have a value of 0.33). This shows impressively how AF4 enables a full characterization according to size, shape/conformation, and molar mass, also for dendrimers of high molar mass, where other methods like SEC or MS suffer from problems.

The delivery of genetic material, e.g., plasmid DNA (pDNA) or small interfering RNA (siRNA) represents a promising strategy for the treatment of genetic diseases by expression of transferred proteins or inhibition of protein synthesis.^{73,74} Therefore, gene carriers, which are able to deliver nucleic acids into eukaryotic cells, are in the focus of scientists since decades.^{75,76} Common nonviral systems for this approach are complexes based on cationic polymers (polyplexes) or lipids (lipopolyplexes).^{77–79} As crucial characteristics as cytotoxicity, cellular uptake, or transfection efficiency strongly depend on physicochemical parameters like polymer molar mass and

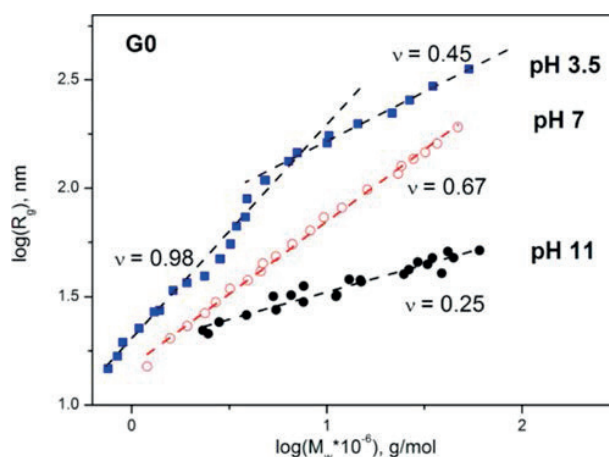


Figure 4. Scaling-law relationships obtained by AF4 of a maleimide copolymer at different pH. Reprinted from ref 70. Copyright 2012 American Chemical Society.

architecture, a detailed characterization of the used polyelectrolytes and the formed polyplexes is mandatory. In particular, the determination of the molar mass of cationic polymers is still challenging. For example, SEC is problematic due to strong interactions of the polyelectrolyte with the stationary phase and the lack of suitable standards.⁸⁰ Other methods like light scattering or nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy just provide average values and no information about polydispersity. Here, AF4-MALLS can overcome some of these challenges enabling the determination of accurate size and molar mass distributions of the used polymers and formed polyplexes.⁸¹ A detailed study on polyplexes prepared from pDNA and rhodamine B labeled chitosan was performed by Ma et al.^{82–84} The most important challenge for successful AF4 separation and analysis of gene carriers is the establishment of an eluent composition and membrane material suitable for such heterogeneous mixtures, containing a cationic polymer, anionic DNA/RNA, and complexes of different net-charge (depending on the mixing ratio). Therefore, the membrane has to be compatible with different charges and varying degrees of hydrophobicity of all components to ensure proper retention and negligible sample adsorption. In the present case, this problem was solved by an amphiphilic RC membrane and an acetate buffer (pH 4). Fractograms of the polyplexes and pure chitosan are shown in Figure 5.⁸³ The first peak is associated with the free chitosan, while the second peak is related to the formed polyplexes. Here, AF4-MALLS-DLS has the outstanding advantage to characterize the polyplexes in terms of size and shape and to separate and quantify the free polymer in a single experiment. In contrast, traditional methods as ultracentrifugation are more time-consuming. Anyhow, results from both methods are in excellent agreement.⁸³ In particular for polyplexes, the accurate determination of the amount of free polymer is inevitable, as far as it influences the cytotoxicity and the transfection efficiency and reveals information about the composition and the virtual N/P ratio (nitrogen to phosphorus) realized within the polyplexes.⁸⁵

In the work of Ma et al., all polyplexes prepared with a N/P ratio of 3–15 (at mixing) resulted in a virtual N/P ratio of 1.3–1.6. As mentioned above, information about shape of the polyplexes can be obtained by calculation of R_g/R_H . Dependent of the molar mass, structure, and concentration of the single

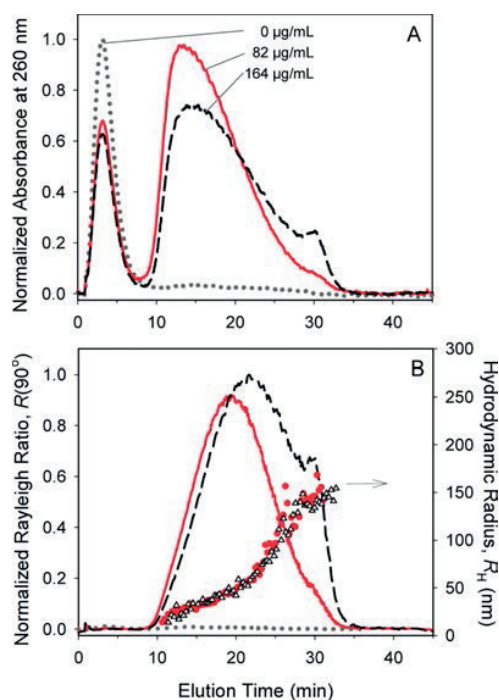


Figure 5. AF4 fractogram of chitosan/DNA polyplexes at different DNA concentrations (gray, 0 $\mu\text{g mL}^{-1}$; red, 82 $\mu\text{g mL}^{-1}$; black, 164 $\mu\text{g mL}^{-1}$; N/P, 5). (A) Absorbance at 260 nm, (B) Rayleigh ratio at 90° (lines) and hydrodynamic radius (symbols). Reprinted from ref 83. Copyright 2010 American Chemical Society.

components, values between 1.0 and 1.5 were obtained for the polyplexes, indicating a conformation ranging from a soft “Gaussian” sphere up to that of a polymeric star. In agreement with previous studies, the authors suggested that the polyplexes form spherical clusters with unbound chitosan loops or tails on the surface.⁸³ The merit of AF4-MALLS-DLS in this case is that information about shape/conformation can be assigned to each fraction of the whole sample in a fast and reliable manner, which allows the identification of differently shaped species in a solution or population. To prove AF4 results, a fraction collector can easily be coupled to the system and the fractions can be analyzed by other techniques, e.g., scanning electron microscopy (SEM) (Figure 6).⁸⁴

Liposomes. Biological systems related to nanomedicine involve biotherapeutics, proteins, viruses, virus-like-particles

(VLP), and liposomes. Liposomes are phospholipid vesicles, which can contain hydrophilic substances encapsulated into the inner aqueous core and/or lipophilic drugs incorporated into the phospholipid bilayer, both, separate, or simultaneously.⁸⁶ The first liposomal and nanoscaled drug delivery system that received regulatory approval by the FDA in 1995 was Doxil containing the anthracycline antibiotic doxorubicin for the treatment of Kaposi’s sarcoma.⁸⁷ Today, various liposomal drug delivery systems are already FDA-approved for clinical use.⁸⁸ Size and size distribution are thereby the two key factors during the development of liposomal formulations. While smaller liposomes can decrease complement recognition and improve bioavailability, larger liposomes can increase the drug payload.^{89,90} One possibility to access these drug distributions and drug recovery in liposomes is the use of radioactive double labeling and fractionation by AF4 combined with subsequent analysis via liquid scintillation counting (LSC).³⁶ In a study of Kuntsche et al., the recovery rate of the lipid component is usually over 90%, while the recovery rate of the incorporated drug is highly dependent on its octanol–water partition coefficient ($\log P$). For the lipophilic photosensitizer mTHPC, a recovery rate of at least 82% was measured. However, the recovery rates for other drugs like testosterone (11%) and corticosterone (2%) were much lower, pointing out a possible drawback of AF4.³⁶ Traces of all drugs were detected in the membrane, and testosterone as well as corticosterone were found in the cross-flow outlet too. It can be supposed that there is some kind of “washing out phenomena” due to the high dilution and membrane interactions during AF4 analysis. For EPC (egg phosphatidylcholine) liposomes, Hupfeld et al. assumed that sample loss and delay in elution were caused by adsorption phenomena. Probably, there are “reactive spots” on the membrane with an increased interaction between liposomes and the membrane as visualized by membrane photographs after injection of rhodamine labeled phosphatidylethanolamine liposomes.⁹¹ During a sequence of injections, adsorption becomes less prominent and the AUC is increasing until a constant elution behavior is obtained. Obviously, a certain amount of liposomes is necessary to saturate those spots whose quantity fluctuates between different membranes.⁹¹ Interestingly, Kuntsche et al. could not observe this effect for DPPC/DPPG liposomes.³⁶ Moreover, by studying the drug to lipid ratio by AF4, it was recently shown that the incorporation of membrane additives into fluid state liposomes composed of POPC and POPG can lead to a change of bending stiffness of the lipid bilayer.⁹² As smaller liposomes show in principal a

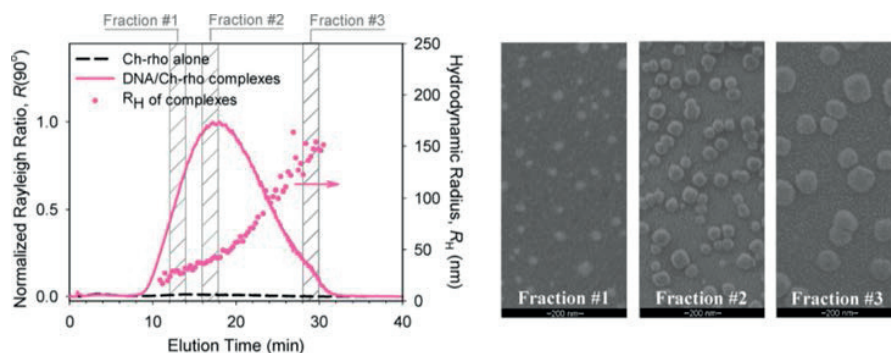


Figure 6. (Left) AF4 fractogram of chitosan/DNA polyplexes. (Right) ESEM images of collected fractions at indicated time intervals. It can be seen that AF4 and ESEM results are in excellent agreement. Reprinted from ref 84. Copyright 2010 American Chemical Society.

higher curvature than larger ones, this will result in a selective partitioning of bilayer additives with respect to the liposome's size. A comparison of AF4-MALLS with LSC of the individual fractions showed that cholesterol is enriched in larger (less strongly curved) liposomes as it rigidifies the host membrane. Contrary, mTHPC softens the membrane leading to an increased accumulation in smaller liposomes.⁹²

Proteins and Viruses. Another application of AF4 is in protein separation, particularly for biotherapeutics. These formulations comprises a worldwide annual volume over \$110 billion, including blockbusters such as adalimumab (Humira, AbbVie, \$3.5 billion in 2011), infliximab (Remicade, Centocor, \$3.5 billion in 2011), and etanercept (Enbrel, Amgen, \$3.4 billion in 2011).⁹³ AF4 represents a well-suitable method for the challenging task of fast and reliable characterization for formulation development and to ensure drug safety of biotherapeutics.^{94–96} After careful optimization of the eluent composition, AF4 enables an accurate quantification of monomer content and associates/aggregates in protein formulations as it allows a separation/characterization over the entire size range of a few nanometer to several micrometers.⁹⁷ For example, Veurink et al. investigated the aggregation breaking effect of different anti-inflammatory corticosteroids, (e.g., dexamethasone phosphate) on the angiogenesis inhibitors bevacizumab (Avastin, Roche) and ranibizumab (Lucentis, Novartis).^{95,96} By using AF4, it was possible to show that the addition of corticosteroids reduces dimer and trimer content and, therefore, stabilize the antibody remarkably. Furthermore, AF4 can provide a closer look into the aggregation behavior concerning aggregates shape. Utilizing the shape ratio obtained by AF4-MALLS-DLS, the shape of different aggregates can be related to their biological effect. An impressive example was given by Silveira et al., who investigated the relationship between infectivity, converting activity, and the size and shape of protease resistant prion protein (PrP^{res})-containing aggregates.⁹⁸ It could be shown that highest specific infectivity and highest specific converting activity was attributed to nonfibrillar particles of about 17–27 nm, correlating to a molar mass of 300–600 kDa and a fairly compact, spherical or ellipsoid form ($R_g/R_H = 0.9$). Larger aggregates (50–230 nm) showed substantially lower activities and R_g/R_H increases up to 2.35 indicating the formation of highly extended structures like fibrils, whereas smaller oligomers with ≤ 5 monomers revealed no visible infectivity and almost no converting activity.⁹⁹ These findings could provide new insights for the treatment of PrP related diseases. As AF4 works without a stationary phase, mechanical or shear stress on proteins (typical for SEC measurements) is minimal and the biological activity of such delicate samples can be preserved.¹⁰⁰ Moreover, an eluent similar to the native medium or formulation buffer can be used to preserve the native state of the protein, which is usually not possible using methods like density gradient ultracentrifugation, a standard technique for this purpose.^{101,102} Besides, SEC often requires high ionic strengths in order to avoid interactions with the stationary phase, which influences the protein conformation, too.

AF4 is also capable to separate complex samples like human serum and its components.^{27,103,104} In this field, also manifold progress concerning technical developments can be observed. For example, Yohannes et al. used a miniaturized AF4 with a total volume of 0.25 mL to study lipoprotein aggregation and fusion and they were able to separate the different lipoprotein classes, including the HDL-subclasses HDL₂ as well as

HDL₃.¹⁰⁵ For lipoprotein particle detection in serum samples of patients with coronary artery disease (CAD), Lee et al. established a guard channel washing process, which enabled the depletion of smaller proteins leading to a reduced membrane contamination.¹⁰⁶ An online coupling of AF4 and a dual enzymatic reaction system to detect cholesterol and triglyceride was presented by Qureshi et al. and Rambaldi et al.^{103,107} After a miniaturized AF4 serum separation, the channel-flow was split into two lines and enzymatic reagents to determine cholesterol and triglyceride levels were pumped into the respective line, which acted as an enzymatic reactor. Validation of the system revealed results comparable with standard enzymatic reactions and the literature.¹⁰⁸ Furthermore, the coupling of chip-type AF4 and electrospray ionization tandem mass spectrometry (ESI-MS-MS), recently shown by Kim et al., provides additional information and enables a high-speed screening of specific lipids contained in blood serum and lipoproteins (top-down lipidomic analysis).^{27,109} Finally, a two-dimensional separation method using an online multilane channel system for isoelectric focusing (IEF) and AF4 was developed by Kim et al. in order to analyze human urinary proteomes.^{110,111} The experimental setup is shown in Figure 7. First, proteins were

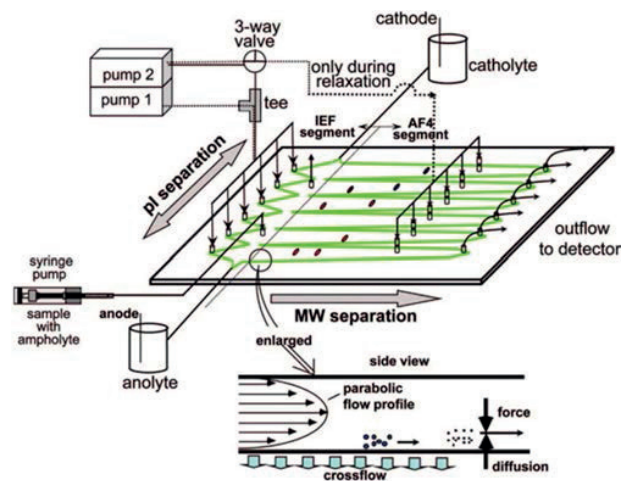


Figure 7. Schematics of a multilane AF4 channel for IEF-AF4. First the proteins are separated by IEF. Afterward, protein bands are transferred to each of the six channel lanes for separation by AF4. Reprinted from ref 111. Copyright 2009 American Chemical Society.

separated according to their isoelectric point by mixing the sample with ampholyte solution and injection into the IEF segment. When IEF separation was completed, the bands were transferred to the AF4 channels through six outlets. After validation of the system by separating a mixture of various protein standards with known size and pI, human urinary proteomes were separated, fractions were collected and further analyzed by ESI-MS/MS after tryptic digestion. The authors could identify 245 urinary proteins, thereof 110 unknown.¹¹⁰ Last but not least, McEvoy et al. developed a method for virus counting utilizing AF4.¹¹² A sample of known concentration of influenza virus was separated and the particle sizes as well as the aggregation states were determined. It was demonstrated that a method to count spherical particles can be applied to quantify the total amount of disaggregated virus species. Calculations revealed a total number of 2.79×10^{10} virus particles per

experiment, which corresponds to a deviation of only 1.9% compared with the theoretical value of 2.9×10^{10} .

CONCLUSION AND OUTLOOK

As presented, AF4 is still further emerging and shows great potential for pharmaceutical laboratories as it represents a highly flexible and powerful analytical technique applicable to nearly all fields in life sciences, in particular nanomedicine. For drug and gene delivery, the power of AF4 is the gentle separation of polymeric nanoparticles or self-assembled systems from residual polymer, aggregates or drug/dye without disturbing the self-assembled structure and simultaneously characterization. Several advantages and applications were discussed. The missing of a stationary phase reduces interactions and adsorption effects and enables analysis of highly sensitive samples like biotherapeutics or polyplexes under biological relevant conditions. Moreover, the separation channel is simple in physical terms and experimental parameters can be adjusted easily. Furthermore, the possibility to use nearly any aqueous or organic solvent, a broad separation range from 1 nm to 100 μm , and the easy coupling to analytical techniques like MALLS or ICPMS renders AF4 a powerful method for separation and characterization of fragile and complex mixtures.^{2,113} Comparison with batch techniques like DLS, SLS, and others shows that an analysis including a fractionation in the starting phase of a project provides a better understanding of the investigated system, avoiding misinterpretation due to average values or the presence of aggregates. Nevertheless, some drawbacks and challenges do exist. Up until now, AF4 is more laborious, expensive to use, and not routinely available in analytical laboratories. Additionally, almost every study needs also alternative particle characterization techniques (e.g., electron microscopy) in parallel to obtain full insight into the investigated system. Besides, even if the general range of AF4 scales from 1 nm to several μm , the separation of particles in one sample with larger differences in size will lead to peak broadening and a loss of resolution and might be impossible (more than a factor of 50 in size) in a single experiment. The optimization procedure of all parameters, necessary for each sample, limits the advantage of a short measurement time and is in conflict with the establishment of AF4 as a routinely applied standard method like SEC. An awareness of possible sample loss due to adsorption on the membrane is highly recommended. Furthermore, the interaction with the membrane often affects the retention behavior, which might lead to peak broadening or tailing, perturbation of the separation of compounds, or complete retaining of single particles/macromolecules. Particle–membrane interactions are also a major problem for accurate quantification of single fractions. In particular, for mixtures of compounds, where charge and hydrophobicity differ, extensive screening of different membranes and eluent compositions is often required. This presents a grand challenge for manufacturers as there is a need for improved membranes, especially designed for FFF applications, providing a flat and smooth surface with uniform pore sizes and surface charge. Further developments will also include new channel designs like hollow-fiber flow field-flow fractionation (HFS) or miniaturization of AF4 channels for saving solvent, time, and sample material.^{114,115} Moreover, modifications like “frit-inlet”,¹¹⁶ where a part of the top wall is substituted by a permeable frit thereby avoiding a focus procedure or “frit-outlet”,¹¹⁷ where a frit at the end of the channel removes the upper part of the outlet stream, leading to higher detector

concentration (enrichment factors of around 3–6) become more and more established in the last years. From our point of view, there is also a trend in studying highly heterogeneous systems, e.g., nanoparticles, polyplexes, or liposomes and their interaction with human blood serum or cell culture media relevant for biotechnology related issues. This can reveal information about the formation of protein corona, a topic which is paid increasing attention and AF4 can help to understand how drug/gene delivery systems behave in a natural environment like the human body. However, the interest in AF4 is still growing and AF4 will help to understand and analyze systems, where other methods are inadequate. Once the method is established, AF4 is a multifunctional technique for separation and characterization of nearly all nanosized soft and hard matter in a short time. In particular, in the field of nanomedicine, AF4 helps to analyze small changes in size distribution or drug loading efficiency, which are important aspects of quality control and essential for regulatory affairs and medical approval.

ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

Four tables of pharmaceutical relevant systems analyzed by AF4. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*E-mail: ulrich.schubert@uni-jena.de.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Carl-Zeiss Foundation (Strukturantrag JCSM).

REFERENCES

- (1) Qureshi, R. N.; Kok, W. T. *Anal. Bioanal. Chem.* **2011**, *399*, 1401–1411.
- (2) Levin, S. *Biomed. Chromatogr.* **1991**, *5*, 133–137.
- (3) Fraunhofer, W.; Winter, G. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2004**, *58*, 369–383.
- (4) Grushka, E.; Caldwell, K. D.; Myers, M. N.; Giddings, J. C. *Sep. Purif. Methods* **1973**, *2*, 127–151.
- (5) Wahlund, K. G.; Giddings, J. C. *Anal. Chem.* **1987**, *59*, 1332–1339.
- (6) Myers, M. N. *J. Microcolumn Sep.* **1997**, *9*, 151–162.
- (7) Giddings, J. C.; Myers, M. N.; Caldwell, K. D.; Pav, J. W. *J. Chromatogr.* **1979**, *185*, 261–271.
- (8) Wahlund, K. G.; Zattoni, A. *Anal. Chem.* **2002**, *74*, S621–S628.
- (9) Giddings, J. C. *J. Chem. Phys.* **1968**, *49*, 81–85.
- (10) Giddings, J. C.; Yang, F. J.; Myers, M. N. *Anal. Chem.* **1976**, *48*, 1126–1132.
- (11) Giddings, J. C. *Pure Appl. Chem.* **1979**, *51*, 1459–1471.
- (12) Schimpf, M. E.; Caldwell, K. D.; Giddings, J. C. *Field-Flow Fractionation Handbook*; Wiley: New York, 2000.
- (13) Giddings, J. C. *Science* **1993**, *260*, 1456–1465.
- (14) Qing, D.; Schimpf, M. E. *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 2478–2485.
- (15) Martin, M. *Chromatographia* **1982**, *15*, 426–432.
- (16) Roessner, D.; Kulicke, W. M. *J. Chromatogr., A* **1994**, *687*, 249–258.
- (17) Jiang, Y.; Miller, M. E.; Li, P.; Hansen, M. E. *Am. Lab.* **2000**, *32*, 98–99.
- (18) Krahn, W.; Luckas, M.; Lucas, K. *Part. Part. Syst. Char.* **1988**, *5*, 72–76.

- (19) Beckett, R. *At. Spectrosc.* **1991**, *12*, 228–232.
- (20) Dubascoux, S.; Le Hecho, I.; Hasseløev, M.; Von der Kammer, F.; Gautier, M. P.; Lespes, G. *J. Anal. At. Spectrom.* **2010**, *25*, 613–623.
- (21) Thang, N. M.; Knopp, R.; Geckeis, H.; Kim, J. I.; Beck, H. P. *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 1–5.
- (22) Mes, E. P. C.; de Jonge, H.; Klein, T.; Welz, R. R.; Gillespie, D. T. *J. Chromatogr., A* **2007**, *1154*, 319–330.
- (23) von der Kammer, F.; Baborowski, M.; Fries, K. *J. Chromatogr., A* **2005**, *1100*, 81–89.
- (24) Exner, A.; Theisen, M.; Panne, U.; Niessner, R. *Fresenius J. Anal. Chem.* **2000**, *366*, 254–259.
- (25) Thünemann, A. F.; Knappe, P.; Bienert, R.; Weidner, S. *Anal. Methods* **2009**, *1*, 177–182.
- (26) Knappe, P.; Boehmert, L.; Bienert, R.; Karmutzki, S.; Niemann, B.; Lampen, A.; Thünemann, A. F. *J. Chromatogr., A* **2011**, *1218*, 4160–4166.
- (27) Kim, K. H.; Lee, J. Y.; Lim, S.; Moon, M. H. *J. Chromatogr., A* **2013**, *1280*, 92–97.
- (28) Johannes, G.; Jussila, M.; Hartonen, K.; Riekkola, M.-L. *J. Chromatogr., A* **2011**, *1218*, 4104–4116.
- (29) Otte, T.; Pasch, H.; Macko, T.; Brull, R.; Stadler, F. J.; Kaschta, J.; Becker, F.; Buback, M. *J. Chromatogr., A* **2011**, *1218*, 4257–4267.
- (30) Williams, S. K. R.; Lee, D. J. *Sep. Sci.* **2006**, *29*, 1720–1732.
- (31) Giddings, J. C. *J. Chromatogr.* **1989**, *470*, 327–335.
- (32) Stevenson, S. G.; Preston, K. R. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **1997**, *20*, 2835–2842.
- (33) Benincasa, M. A.; Giddings, J. C. *Anal. Chem.* **1992**, *64*, 790–798.
- (34) Benincasa, M. A.; Delle Fratte, C. *J. Chromatogr., A* **2004**, *1046*, 175–184.
- (35) Ulrich, A.; Losert, S.; Bendixen, N.; Al-Kattan, A.; Hagedorfer, H.; Nowack, B.; Adlhart, C.; Ebert, J.; Lattuada, M.; Hungerbühler, K. *J. Anal. At. Spectrom.* **2012**, *27*, 1120–1130.
- (36) Kuntsche, J.; Decker, C.; Fahr, A. *J. Sep. Sci.* **2012**, *35*, 1993–2001.
- (37) Hupfeld, S.; Ausbacher, D.; Brandl, M. *J. Sep. Sci.* **2009**, *32*, 1465–1470.
- (38) Hupfeld, S.; Moen, H. H.; Ausbacher, D.; Haas, H.; Brandl, M. *Chem. Phys. Lipids* **2010**, *163*, 141–147.
- (39) Alpermann, T.; Rüdel, K.; Rüger, R.; Steiniger, F.; Nietzsche, S.; Filiz, V.; Förster, S.; Fahr, A.; Weigand, W. *Orig. Life Evol. Biosph.* **2011**, *41*, 103–119.
- (40) Moon, M. H.; Park, I.; Kim, Y. H. *J. Chromatogr., A* **1998**, *813*, 91–100.
- (41) Alasonati, E.; Benincasa, M. A.; Slaveykova, V. I. *J. Sep. Sci.* **2007**, *30*, 2332–2340.
- (42) Wagner, M.; Reiche, K.; Blume, A.; Garidel, P. *Colloids Surf., A* **2012**, *415*, 421–430.
- (43) Lang, T.; Eslahian, K. A.; Maskos, M. *Macromol. Chem. Phys.* **2012**, *213*, 2353–2361.
- (44) Benincasa, M. A.; Caldwell, K. D. *J. Chromatogr., A* **2001**, *925*, 159–169.
- (45) Wittgren, B.; Wahlund, K. G. *J. Chromatogr., A* **1997**, *791*, 135–149.
- (46) Adolphi, U.; Kulicke, W. M. *Polymer* **1997**, *38*, 1513–1519.
- (47) Demeule, B.; Palais, C.; Machaidze, G.; Gurny, R.; Arvinte, T. *mAbs* **2009**, *1*, 142–150.
- (48) Katz, E.; Willner, I. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2004**, *43*, 6042–6108.
- (49) Fedotov, P. S.; Vanifatova, N. G.; Shkinev, V. M.; Spivakov, B. Y. *Anal. Bioanal. Chem.* **2011**, *400*, 1787–1804.
- (50) Shimoda, A.; Sawada, S.; Kano, A.; Maruyama, A.; Moquin, A.; Winnik, F. M.; Akiyoshi, K. *Colloids Surf., B* **2012**, *99*, 38–44.
- (51) Belete, A.; Mäder, K. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **2013**, *39*, 186–196.
- (52) Melucci, M.; Zambianchi, M.; Barbarella, G.; Manet, I.; Montalti, M.; Bonacchi, S.; Rampazzo, E.; Rambaldi, D. C.; Zattoni, A.; Reschiglian, P. *J. Mater. Chem.* **2010**, *20*, 9903–9909.
- (53) Vollrath, A.; Schubert, S.; Schubert, U. S. *J. Mater. Chem. B* **2013**, *1*, 1994–2007.
- (54) Al-Hajaj, N. A.; Moquin, A.; Neibert, K. D.; Soliman, G. M.; Winnik, F. M.; Maysinger, D. *ACS Nano* **2011**, *5*, 4909–4918.
- (55) Cabral, H.; Matsumoto, Y.; Mizuno, K.; Chen, Q.; Murakami, M.; Kimura, M.; Terada, Y.; Kano, M. R.; Miyazono, K.; Uesaka, M.; Nishiyama, N.; Kataoka, K. *Nat. Nanotechnol.* **2011**, *6*, 815–823.
- (56) Reschiglian, P.; Rambaldi, D. C.; Zattoni, A. *Anal. Bioanal. Chem.* **2011**, *399*, 197–203.
- (57) Fraunhofer, W.; Winter, G.; Coester, C. *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 1909–1920.
- (58) Schultes, S.; Mathis, K.; Zillies, J.; Zwioerek, K.; Coester, C.; Winter, G. *LC GC Eur.* **2009**, *22*, 390–403.
- (59) Zillies, J. C.; Zwioerek, K.; Winter, G.; Coester, C. *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 4574–4580.
- (60) Knop, K.; Mingotaud, A.-F.; El-Akra, N.; Violleau, F.; Souchard, J.-P. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2009**, *8*, 396–404.
- (61) Ehrhart, J.; Mingotaud, A.-F.; Violleau, F. *J. Chromatogr., A* **2011**, *1218*, 4249–4256.
- (62) Lederer, A.; Boye, S. *LC GC Eur.* **2011**, *24*, 620–628.
- (63) Boye, S.; Polikarpov, N.; Appelhaus, D.; Lederer, A. *J. Chromatogr., A* **2010**, *1217*, 4841–4849.
- (64) Schacher, F. H.; Elbert, J.; Patra, S. K.; Yusoff, S. F. M.; Winnik, M. A.; Manners, I. *Chem.—Eur. J.* **2012**, *18*, 517–525.
- (65) Loos, K.; Boker, A.; Zettl, H.; Zhang, A. F.; Krausch, G.; Müller, A. H. E. *Macromolecules* **2005**, *38*, 873–879.
- (66) Wittgren, B.; Wahlund, K. G.; Derand, H.; Wesslen, B. *Macromolecules* **1996**, *29*, 268–276.
- (67) Petrov, P. D.; Drechsler, M.; Müller, A. H. E. *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 4218–4225.
- (68) Knop, K.; Pretzel, D.; Urbanek, A.; Rudolph, T.; Scharf, D. H.; Schallon, A.; Wagner, M.; Schubert, S.; Kiehnopf, M.; Brakhage, A. A.; Schacher, F. H.; Schubert, U. S. *Biomacromolecules* **2013**, *14*, 2536–2548.
- (69) Johannes, G.; Shan, J.; Jussila, M.; Nuopponen, M.; Tenhu, H.; Riekkola, M.-L. *J. Sep. Sci.* **2005**, *28*, 435–442.
- (70) Boye, S.; Appelhaus, D.; Boyko, V.; Zschoche, S.; Komber, H.; Friedel, P.; Formanek, P.; Janke, A.; Voit, B. I.; Lederer, A. *Biomacromolecules* **2012**, *13*, 4222–4235.
- (71) Burchard, W. *Adv. Polym. Sci.* **1999**, *143*, 113–194.
- (72) Nilsson, L. *Food Hydrocolloids* **2013**, *30*, 1–11.
- (73) Fire, A.; Xu, S. Q.; Montgomery, M. K.; Kostas, S. A.; Driver, S. E.; Mello, C. C. *Nature* **1998**, *391*, 806–811.
- (74) Lee, J. B.; Hong, J.; Bonner, D. K.; Poon, Z.; Hammond, P. T. *Nat. Mater.* **2012**, *11*, 316–322.
- (75) Behr, J. P. *Acc. Chem. Res.* **2012**, *45*, 980–984.
- (76) Boussif, O.; Lezoualch, F.; Zanta, M. A.; Mergny, M. D.; Scherman, D.; Demeneix, B.; Behr, J. P. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1995**, *92*, 7297–7301.
- (77) Wagner, M.; Rinkenauer, A. C.; Schallon, A.; Schubert, U. S. *RSC Adv.* **2013**, *3*, 12774–12785.
- (78) Synatschke, C. V.; Schallon, A.; Jerome, V.; Freitag, R.; Müller, A. H. E. *Biomacromolecules* **2011**, *12*, 4247–4255.
- (79) Lee, H.; Williams, S. K.; Allison, S. D.; Anchordoquy, T. J. *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 837–843.
- (80) Guillauneuf, Y.; Castignolles, P. *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **2008**, *46*, 897–911.
- (81) Wagner, M.; Pietsch, C.; Tauhardt, L.; Schallon, A.; Schubert, U. S. *J. Chromatogr., A* **2013**, *1325*, 195–203.
- (82) Ma, P. L.; Buschmann, M.; Winnik, F. M. In *Abstracts of Papers: 240th Annual American Chemical Society Meeting*, Boston, MA, August 22–26, 2010; Publication No. 477.
- (83) Ma, P. L.; Buschmann, M. D.; Winnik, F. M. *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 9636–9643.
- (84) Ma, P. L.; Buschmann, M. D.; Winnik, F. M. *Biomacromolecules* **2010**, *11*, 549–554.
- (85) Akinc, A.; Thomas, M.; Klivanov, A. M.; Langer, R. J. *Gene Med.* **2005**, *7*, 657–663.
- (86) Buse, J.; El-Anead, A. *Nanomedicine* **2010**, *5*, 1237–1260.
- (87) Barenholz, Y. *J. Controlled Release* **2012**, *160*, 117–34.
- (88) Chang, H. I.; Yeh, M. K. *Int. J. Nanomed.* **2012**, *7*, 49–60.

- (89) Hupfeld, S.; Holsaeter, A. M.; Skar, M.; Frantzen, C. B.; Brandl, M. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2006**, *6*, 3025–3031.
- (90) Yohannes, G.; Pystynen, K. H.; Riekkola, M.-L.; Wiedmer, S. K. *Anal. Chim. Acta* **2006**, *560*, 50–56.
- (91) Hupfeld, S.; Ausbacher, D.; Brandl, M. *J. Sep. Sci.* **2009**, *32*, 3555–3561.
- (92) Decker, C.; Fahr, A.; Kuntsche, J.; May, S. *Chem. Phys. Lipids* **2012**, *165*, 520–529.
- (93) Bartholow, M. *Pharm. Times* July, 10, **2012**.
- (94) Smith, M. H.; South, A. B.; Gaulding, J. C.; Lyon, L. A. *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 523–530.
- (95) Veurink, M.; Stella, C.; Tabatabay, C.; Pournaras, C. J.; Gurny, R. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2011**, *78*, 271–277.
- (96) Veurink, M.; Westermaier, Y.; Gurny, R.; Scapozza, L. *Pharm. Res.* **2013**, *30*, 1176–1187.
- (97) Weber, C.; Wagner, M.; Baykal, D.; Höppener, S.; Paulus, R. M.; Festag, G.; Altuntas, E.; Schacher, F. H.; Schubert, U. S. *Macromolecules* **2013**, *46*, 5107–5116.
- (98) Silveira, J. R.; Raymond, G. J.; Hughson, A. G.; Race, R. E.; Sim, V. L.; Hayes, S. F.; Caughey, B. *Nature* **2005**, *437*, 257–261.
- (99) Silveira, J. R.; Hughson, A. G.; Caughey, B. *Method Enzymol* **2006**, *412*, 21–33.
- (100) Rambaldi, D. C.; Zattoni, A.; Reschiglian, P.; Colombo, R.; De Lorenzi, E. *Anal. Bioanal. Chem.* **2009**, *394*, 2145–2149.
- (101) Rambaldi, D. C.; Reschiglian, P.; Zattoni, A. *Anal. Bioanal. Chem.* **2011**, *399*, 1439–1447.
- (102) Witos, J.; Cilpa, G.; Yohannes, G.; Oorni, K.; Kovanen, P. T.; Jauhiainen, M.; Riekkola, M.-L. *J. Sep. Sci.* **2010**, *33*, 2528–2535.
- (103) Qureshi, R. N.; Kok, W. T.; Schoenmakers, P. J. *Anal. Chim. Acta* **2009**, *654*, 85–91.
- (104) Qureshi, R. N.; Kaal, E.; Janssen, H.-G.; Schoenmakers, P. J.; Kok, W. T. *Anal. Chim. Acta* **2011**, *706*, 361–366.
- (105) Yohannes, G.; Sneek, M.; Varjo, S. J.; Jussila, M.; Wiedmer, S. K.; Kovanen, P. T.; Oorni, K.; Riekkola, M.-L. *Anal. Biochem.* **2006**, *354*, 255–265.
- (106) Lee, J. Y.; Choi, D.; Johan, C.; Moon, M. H. *J. Chromatogr., A* **2011**, *1218*, 4144–4148.
- (107) Rambaldi, D. C.; Reschiglian, P.; Zattoni, A.; Johann, C. *Anal. Chim. Acta* **2009**, *654*, 64–70.
- (108) Li, P.; Hansen, M.; Giddings, J. C. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **1997**, *20*, 2777–2802.
- (109) Kim, K. H.; Moon, M. H. *Anal. Chem.* **2011**, *83*, 8652–8658.
- (110) Kim, K. H.; Moon, M. H. *J. Proteome Res.* **2009**, *8*, 4272–4278.
- (111) Kim, K. H.; Moon, M. H. *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 1715–1721.
- (112) McEvoy, M.; Razinkov, V.; Wei, Z. P.; Casas-Finet, J. R.; Tous, G. I.; Schenerman, M. A. *Biotechnol. Prog.* **2011**, *27*, 547–554.
- (113) Messaud, F. A.; Sanderson, R. D.; Runyon, J. R.; Otte, T.; Pasch, H.; Williams, S. K. R. *Prog. Polym. Sci.* **2009**, *34*, 351–368.
- (114) Johann, C.; Elsenberg, S.; Roesch, U.; Rambaldi, D. C.; Zattoni, A.; Reschiglian, P. *J. Chromatogr., A* **2011**, *1218*, 4126–4131.
- (115) Oh, S.; Kang, D.; Ahn, S.-M.; Simpson, R. J.; Lee, B.-H.; Moon, M. H. *J. Sep. Sci.* **2007**, *30*, 1082–1087.
- (116) Giddings, J. C. *Anal. Chem.* **1990**, *62*, 2306–2312.
- (117) Li, P.; Hansen, M.; Giddings, J. C. *J. Microcolumn Sep.* **1998**, *10*, 7–18.

Supporting Information

Asymmetric flow field-flow fractionation in the field of nanomedicine

Michael Wagner,^{1,2} Stephan Holzschuh,³ Anja Traeger,^{1,2} Alfred Fahr^{2,3},
Ulrich. S. Schubert^{1,2*}

*1 - Laboratory of Organic and Macromolecular Chemistry (IOMC), Friedrich Schiller University
Jena, Humboldtstrasse 10, 07743 Jena, Germany*

*2 - Jena Center for Soft Matter (JCSM), Friedrich Schiller University Jena, Philosophenweg 7,
07743 Jena, Germany*

*3 - Department of Pharmaceutical Technology, Friedrich Schiller University Jena, Lessingstrasse 8,
07743 Jena, Germany*

ulrich.schubert@uni-jena.de; www.schubert-group.com

Abstract

Asymmetric flow field-flow fractionation (AF4) is a widely used and versatile technique in the family of field-flow fractionations, indicated by a rapidly increasing number of publications. It represents a gentle separation and characterization method, where non-specific interactions are reduced to a minimum, allows a broad separation range from several nano- up to micrometers and enables a superior characterization of homo- and heterogenic systems. In particular, coupling to multi angle light scattering provides detailed access to sample properties. Information about molar mass, polydispersity, size, shape/conformation or density can be obtained nearly independent of the used material. In this perspective, the application and progress of AF4 for (bio)macromolecules and colloids, relevant for “nano” medical and pharmaceutical issues, will be presented. The characterization of different nano-sized drug or gene delivery systems, *e.g.* polymers, nanoparticles, micelles, dendrimers, liposomes, polyplexes, and virus-like-particles (VLP), as well as therapeutic relevant proteins, antibodies, and nanoparticles for diagnostic usage will be discussed. Thereby, the variety of obtained information, the advantages and pitfalls of this emerging technique will be highlighted. Additionally, the influence of different fractionation parameters in the separation process is discussed in detail. Moreover, a comprehensive overview is given, concerning the investigated samples, fractionation parameters as membrane types and buffers used as well as the chosen detectors and the corresponding references. The perspective ends up with an outlook to the future.

Register of pharmaceutical relevant systems analyzed by AF4

Table 1: Nanoparticles (NP).

Analyte	Membrane (MWCO) ^a	Eluent	Detection	Comment	Ref.
ABT-102 (amorphous solid dispersion)	RC (10)	not specified	UV, RI, MALLS		1
C ₆₀ Fullerene	PES (10)	pure water	DLS	Stability in aqueous solutions	2-4
C ₆₀ , C ₇₀ Fullerene	RC (10)	0.4% NaCl	UV, MALLS	<i>In vitro</i> toxicity assessment and separation of BSA from fullerenes	5
Carbon nanotubes (single wall)	RC, CTA, PES	NH ₄ NO ₃ at various pH and ionic strength	MALLS	Length determination	6
CdSe (CdZnS) core-shell QD	RC (10), PES (10)	pure water	UV (300 nm), Fluorescence MALLS, DLS	Uptake and elimination in human cells	7
CdSe/ZnS QD (PEG coated), latex NP	RC (1)	0.1 mM NaN ₃ , 0.01% FL-70	UV (254 nm), Fluorescence	Toxicity in aquatic environment	8
Cellulose nanocrystals	RC (10)	0.02% NaN ₃	RI, MALLS, DLS		9
Gelatin NP	RC (1, 5, 10), PES (1)	5 mM Na ₂ HPO ₄ , 14 mM NaCl, pH 7.4; 2 mM Na ₂ HPO ₄ , 14 mM NaCl, pH 6.0	UV (220, 260, 280 nm), RI, MALLS	Drug loading of nucleic acids and proteins	10
Gelatin NP (PEG coated)	RC (5)	50 mM phosphate buffer, pH 7.0; 50 mM NaCl	UV (260 nm), RI	Quantification of PEG coating	11
Gelatin NP, gelatin, chitosan	RC (5, 10)	gelatin: PBS, pH 6.0; chitosan: 0.5 M acetate buffer, pH 4.0	UV, RI, MALLS		12
Gold nanorods	PES (10)	various ratios of NH ₄ NO ₃ , CTAB (0.5 mM ionic strength)	UV, MALLS, DLS	Influence of eluent composition	13
Gold nanorods	RC (5)	0.02% NaN ₃ ; 0.03% CTAB	UV	Fractionation and investigation of surface plasmon resonance	14
Gold NP	RC (10), PVDF (30)	pure water	UV, MALLS, DLS	Influence of eluent composition	15
Gold NP	RC (10)	0.02% NaN ₃	UV, MALLS, DLS	Adsorption of BSA	16
Gold NP	RC (10)	pure water	UV (525 nm)	Offline characterization by DLS after fraction collection	17
Gold NP	CTA (10), PES (1), PVDF (30), PA	pure water	UV, MALLS, DLS, ICP-MS	Comparison with batch techniques and method development	18
Gold NP	PES (10)	0.01% NaN ₃ , 0.025% FL-70	ICP-MS	Separation of gold NP mixtures and comparison with hydrodynamic chromatography (HDC)	19
Gold NP	CTA (1)	pure water	UV, RI, MALLS	Fluorescent gold clusters	20
Gold NP	PES (10)	0.05% SDS, 3% methanol	MALLS, DLS, ICP-MS	Characterization of NPs in rat liver	21
Gold NP	not specified	not specified	UV, MALLS	Gold NP clusters	22
Gold NP (polymer coated), silica NP (oligothiophene doped), CdSe/ZnS QD (polymer coated)	RC (10, 30)	gold: 10 mM NaCl; silica: 50:50 ethanol/water; 5 mM Tris, pH 8.7; QD: 5 mM borate buffer, pH 9.1, 5 mM NaNO ₃ , 0.02% NaN ₃	UV, RI, MALLS		23

Gold NP, silver NP, TiO ₂ NP	CTA (10), PES (100), PVDF (30)	pure water	UV, MALLS, DLS, ICP-MS	Influence of eluent composition and membrane	24
Iron oxide NP	RC (10)	0.1% Na ₃ PO ₄	UV, SAXS		25
Iron oxide NP	RC	10 mM phosphate buffer, pH 7.4, 5% mannitol	UV (254 nm), MALLS	Stabilization by lipid-based amphiphiles	26
Iron oxide NP	RC (10)	not specified	UV (300 nm), SAXS		27
Iron oxide NP	RC	not specified	UV, MALLS, DLS		28
Iron oxide NP	RC (5)	0.02% NaN ₃	MALLS	Fractionation in a semi-preparative channel	29
Iron oxide NP (Resovist®)	RC (10)	0.2% NovaChem Surfactant 100	UV (300 nm), SAXS		30
Latex core-shell NP	RC (30)	2 mM Tris buffer, 0.03% Brij 35	UV (254 nm), MALLS	Influence of pH, ionic strength, and functionalization on swelling behavior	31
Latex core-shell NP	RC (30)	phosphate buffer at various concentration and pH	UV (254 nm)		32
Latex NP	RC (5)	0.02% NaN ₃ , 0.1% FL-70	UV (254 nm)	Steric FFF	33
Latex NP	RC (30)	0.02% NaN ₃ , 0.1% FL-70	UV (254 nm)		34
Latex NP	not specified	0.02% NaN ₃ , 0.05% SDS	RI, MALLS		35
Latex NP	RC (5)	1 mM NaClO ₄ , 0.01% Tween® 20	MALLS, LIBD	Laser-induced breakdown detection	36
Latex NP	RC	different salts at varying concentration	UV (254 nm)	Specific ion effects	37
Latex NP	RC (10)	0.1% SDS	UV, TALLS (two angle LS)	Aggregation study	38
Latex NP	RC (10)	0.02% NaN ₃ , 0.005% SDS	RI, MALLS		39
Latex NP, bovine serum albumin (BSA), dextran, pectin	not specified	0.1 M NaNO ₃ , 0.02% NaN ₃	RI, MALLS		40
Lecithin/Pluronic® core-shell NP, latex NP	CTA (10)	0.02% NaN ₃	UV (254 nm)		41
Lipid NP (siRNA loaded)	RC (10)	PBS, 0.02% NaN ₃	RI, MALLS	Comparison of SEC and AF4	42
Lopinavir/Ritonavir® containing NP	RC (10)	10 mM NaNO ₃	UV (237 nm), RI, MALLS	NP formation upon dispersion of melt extrudate formulations	43
Magnetite NP (dextran, mitoxantrone coated), TmPO ₄ NP, diclofenac antiserum, albumin, γ-globulin, PSS, sewage plant samples	RC (1, 10), PES (0.3, 2)	1 mM NaCl; PBS, pH 7.4; 30 mM Tris buffer; 0.1% SDS; 0.001% Tween® 20	UV, ICP-MS	Slot-outlet technique used	44
PEG-PLA core-shell NP	RC (10)	0.02% NaN ₃ , 0.05% SDS	UV (254 nm)	Encapsulation of retinoic acid	45
PEG-PLA NP	PES (5)	pure water; 10% fetal bovine serum (FBS); 50% FBS	MALLS	Tumor accumulation of NPs (<i>in vivo</i>)	46
PEG-PLA NP	PES (5)	0.02% NaN ₃	MALLS	<i>In vivo</i> study of NP	47
PLA NP	RC	0.02% NaN ₃ , 0.1% FL-70	UV (254 nm)	Encapsulation of prodrug 5'-octanoyl-CPA	48
PLGA NP	RC (10)	0.1% SDS	UV, MALLS	Comparison of size distributions by DLS, SAXS, AF4, TEM	49

Poly(<i>n</i> -butyl acrylate)-poly(<i>n</i> -butyl methacrylate) (PBA-PBMA) core-shell NP	not specified	0.018% NaCl; 0.003% Tween® 20	MALLS	Detailed characterization of core-shell structure	50
Poly(<i>N</i> -iso-propylacrylamide) nanogel, poly(<i>N</i> -iso-propylmethacrylamide) nanogel	not specified	not specified	UV, MALLS	Core/shell nanogels for drug delivery	51
Poly(<i>N</i> -iso-propylacrylamide)/poly(<i>N</i> -iso-propylmethacrylamide) core/shell nanogels	not specified	formate buffer, pH 3.3 (15 mM ionic strength)	UV, MALLS	Degradable shells on thermoresponsible nanogels	52
Poly(<i>N</i> -iso-propylmethacrylamide) nanogels	not specified	not specified	RI, MALLS	Peptide-functionalized nanogels for targeted siRNA delivery	53
Poly(<i>N</i> -iso-propylmethacrylamide) nanogels	RC (10)	0.02% NaN ₃	RI, MALLS	Degradation of nanogels	54
Poly(organosiloxane) core-shell NP (incorporated iron oxide NP)	PES (4)	5 mM NaCl, 0.01% Tween® 20	UV (254 nm)	Encapsulation of magnetic iron oxide NP into core-shell systems	55
Poly(organosiloxane) core-shell NP, latex NP	RC (10)	toluene	not specified	Determination of Hamaker constants	56
Poly(organosiloxane) NP	RC (10)	0.02% NaN ₃ , 0.01% Tween® 20	UV (254 nm)	Influence of synthesis parameters on size	57, 58
Pullulan-PEG nanogel	RC (10)	PBS, pH 7.4	UV, MALLS, DLS	Crosslinked nanogel for sustained drug release	59
Silica NP	RC (10)	0.02% NaN ₃	RI, MALLS, DLS	Characterization of amine-functionalized silica NP	60
Silica NP (oligothiophenes doped)	RC (10)	0.025% SDS in 50:50 ethanol/water	Fluorescence, MALLS	Color tuning of diagnostic NPs	61
Silica NP (PEG coated)	not specified	0.04% SDS; 0.02% NaN ₃ ; 0.01% NaCl	MALLS	Stability of PEG coated silica NPs	62
Silver NP	RC (10), PES (10), PVDF (30)	carbonate buffer, pH 7.4	UV, MALLS, DLS, ICP-MS	Influence of membrane, eluent and flow conditions	63
Silver NP	PVDF (30)	pure water	UV, MALLS, DLS, ICP-MS	Comparison with batch techniques	64
Silver NP	RC (1), PES (1)	0.01% SDS, pH 8	UV (254 nm), ICP-MS		65
Silver NP	PES (0.3)	5 mM NaNO ₃	UV (254, 400 nm), ICP-MS	Interaction of silver NPs with natural organic matter	66
Silver NP	PES (10)	not specified	UV, DLS	Transformation of silver NPs	67
Silver NP	PES (10)	not specified	UV, MALLS, DLS, ICP-MS	Interaction of silver NPs with natural organic matter	68
Silver NP	RC (10)	pure water	UV (420 nm), ICP-MS		69
Silver NP	RC (10)	0.01% NaN ₃ , 0.025% FL-70	ICP-MS		70
Silver NP	RC (10)	0.02% NaN ₃ , 0.05% SDS	UV, MALLS, ICP-MS	Toxicity of silver NPs in aquatic environment	71
ZnS NP (Mn doped)	RC (5)	pure water	UV (280 nm)		72

^a Molar mass cut-off (MWCO) in kg·mol⁻¹.

Table 2: Polymers and complexes or conjugates formed thereof.

Analyte	Membrane (MWCO) ^a	Eluent	Detection	Comment	Ref.
Amylose- <i>b</i> -poly(styrene)	RC (5)	THF	UV, RI, MALLS		73
Chitosan	RC (10)	0.1 M acetate buffer, pH 4.2, 0.02% NaN ₃	RI, MALLS	Comparison of AF4 and traditional methods	74,75
Chitosan/DNA polyplexes	RC (10) (amphiphilic)	50 mM acetate buffer, pH 4.0 (ionic strength 20 mM by NaCl)	UV (260, 556 nm), MALLS, DLS	Analysis of polyplexes and determination of free chitosan	76-78
Dextran, PEG,	RC	pure water; 0.5 M NaCl	RI	Power-law relationships to calculate M out of D	79

S-4

PSS (poly(styrene sulfonate)), pullulan					
Dextran, pullulan	RC (10)	100 mM NaNO ₃	RI, MALLS	AF4 at different temperatures	80
Dextran, pullulan	RC (10)	pure water; 0.1 M NaCl, 0.02% NaN ₃	RI, MALLS	Resolution and separation range of AF4	81
Ethylhydroxyethyl cellulose	RC (10)	10 mM NaCl, 0.002% NaN ₃	RI, MALLS	Study on conformation	82,83
Gelatin/PSS complexes	not specified	10 mM acetate buffer, pH 5.6, 0.1% Tween® 20	UV	Gelatin/polyelectrolyte complexes	84
Maltose modified hyperbranched PEI	RC (5, 10), PES (5, 10)	0.02% NaN ₃	UV (550 nm, at cross-flow outlet), RI, MALLS	Accumulation wall as ultrafiltration device for small drug molecules	85,86
Maltose-decorated lysine-dendronized maleimide copolymers	RC (10)	0.02% NaN ₃ ; acetate buffer; NaNO ₃	UV (550 nm), RI, MALLS	pH dependency of shape and aggregation	86,87
PEG	RC	varying concentrations of Na ₂ SO ₄ , K ₂ SO ₄	RI	Influence of salt and ionic strength	88
PEG, PSS	PES (10)	various buffers at different ionic strength and pH	UV, ESI-MS		89
PEG- <i>b</i> -PBA	not specified (5)	pure water	RI, UV, MALLS	Formation of vesicles and micelles by amphiphilic block copolymers	90
PEG- <i>b</i> -PCL	RC (10)	0.02% NaN ₃	UV (214, 412 nm), RI, MALLS, DLS	Encapsulation of pheophorbide(a)	91,92
PEG- <i>b</i> -PVP, PEG- <i>b</i> -PLA, PEG- <i>b</i> -PLGA, PEG- <i>b</i> -PCL	PES (5)	50 mM NaCl, 0.05% NaN ₃	RI, MALLS	Interactions of micelles with human plasma	93
Poly(acrylamide), PSS, PVP	PES (8), PP	15 mM HNO ₃ ; Tris-HNO ₃ buffer; varying concentration of KCl, Na ₂ SO ₄	UV (200, 254 nm)		94
Poly(acrylic acid)	RC (5)	50 mM NaCl; 50 mM NaOH; 50 mM glycine	RI, SAXS		95
Poly(amidoamine) dendrimers	RC (10)	0.1 M phosphate buffer at different pH	RI	Interaction of PAMAM with BSA	96
Poly(glycomethacrylate) star (25 arms) based on silsesquioxane NP	not specified (5)	25 mM NaNO ₃ , 0.02% NaN ₃	UV, RI, MALLS	Synthesis and characterization	97
Poly(methacryloxyethyl trimethylammonium chloride)/poly(ethylene glycol)- <i>b</i> -poly(sodium methacrylate) complexes	CTA (10)	NaCl (20, 80, 160 mM)	UV (214 nm)	Charge stoichiometry of polyelectrolyte complexes	98
Poly(methyl glyoxylate-co-potassium glyoxylate)	RC (10)	0.1 M LiNO ₃ , 0.02% NaN ₃	RI, MALLS		99
Poly(<i>N</i> -iso-propylacrylamide)	RC (10)	pure water	UV (212, 254 nm), RI	Investigation of LCST behavior	100
Poly(styrene-co-(methyl methacrylate)-co-(maleic anhydride) (PEG grafted onto)	RC (10)	varying concentrations of Na ₂ SO ₄ , KCl, Na ₃ PO ₄	UV	Influence of salt on charged, amphiphilic copolymers	101,102
Polyaspartate/poly(trimethylammonium propyl methacrylamide chloride) complexes	RC (10)	NaCl; CaCl ₂ at different ionic strength	RI, MALLS; DLS	Water-soluble polyelectrolyte complexes	103
PSS	RC (10)	0.1 M NaNO ₃ , 0.02% NaN ₃	RI, MALLS		104
PSS	RC (10)	0.1 M NaNO ₃ , 0.02% NaN ₃	RI, MALLS	Resolution and separation range of AF4	104
PSS, PVP, latex beads,	RC (10)	0.02% NaN ₃ , 0.01% Tween® 20	UV (260 nm)	Water-soluble polymers	105

S-5

aldolase, BSA, ferritin, thyroglobulin					
Pullulan	RC (10)	0.1 M NaNO ₃ , 0.02% NaN ₃	RI, MALLS		106
PVP	RC (10), PES (10)	pure water	RI, MALLS	Frit inlet, frit outlet	107
PVP	RC (5)	0.1 M NaCl, 0.02% NaN ₃	RI, DLS, SAXS		108
Starch-PEI/DNA polyplexes	RC (5)	PBS, pH 7.4	RI, MALLS	Degradation of hydroxethyl starch-PEI conjugates	109
α-Carrageenan	RC (10)	0.1 M NaCl; 0.1 M KCl, 0.1 M NaI	RI, MALLS	Solution behavior of α-carrageenan	110
κ-Carrageenan	RC (10)	0.1 M NaCl; 0.1 M NaI	RI, MALLS	Conformation under different salt conditions	111
κ-carrageenan xanthan	RC (10)	0.1 M NaCl; 0.1 M NaI	RI, MALLS		112

^a Molar mass cut-off (MWCO) in kg·mol⁻¹.

Table 3: Liposomes.

Analyte	Membrane (MWCO) ^a	Eluent	Detection	Comment	Ref.
DMPC/cholesterol/DCP liposomes (encapsulated sulforhodamine B)	not specified	not specified	MALLS	Entrapment efficiency	113
DMPC/cholesterol/DCP liposomes	RC (10)	PBS	MALLS, DLS	Size distribution of liposomes prepared by microfluidics	114
DMPC/DMPG/cholesterol liposomes (encapsulated hemoglobin)	not specified	PBS, pH 7.3	RI, MALLS	Dependency of preparation parameters on hemoglobin encapsulation efficiency	115 116
DMPC/DMPG/cholesterol/DSPE-PEG 2000/α-tocopherol/K ⁺ ionophore liposomes (encapsulated actin and hemoglobin, LEAChb)	not specified	F-buffer (50 mM KCl, 2 mM MgCl ₂ , 1 mM ATP), pH 8.0	RI, MALLS	Shape, size distribution and encapsulation efficiency of liposomes of LEAChb	117
DMPG liposomes	CTA (10)	5 mM phosphate buffer at various pH and ionic strength (by NaCl)	UV (254, 410 nm)	Interactions with cytochrome c	118
DOPE/DSPC/DSPE-PEG 2000/cholesterol liposomes (encapsulated doxorubicin, Caelyx®)	RC (10)	10 mM NaNO ₃	UV, RI, MALLS	Size distribution and morphology prior and after ultrasound exposure	119
DOTAP/DOPE/DNA complexes, Lipofectamine®/DNA complexes	RC (30), PC (30 nm), PP (0.055- 0.125 μm)	0.089 M Tris- borate buffer, pH 8.6, 0.02% NaN ₃	UV (260 nm), RI, MALLS	Study of cationic lipid/DNA complexes for gene delivery	120
DPPC/DPPG liposomes (encapsulated temoporfin, corticosterone, testosterone)	RC (5, 10)	NaCl (0, 25, 50, 100 mM) + 0.02% NaN ₃	RI, MALLS	Influence of fractionation parameters, offline recovery of drug and lipids	121
DSPC/DSPA liposomes	RC (10)	pure water, 0.05% SDS, 0.02% NaN ₃	UV (254 nm)	Dependency of sonication time and temperature during preparation on size	122
DSPC/DSPE-PEG 500/cholesterol lipid disks	not specified	not specified	UV (214 nm), MALLS		123
EPC liposomes	not specified	10 mM NaNO ₃	RI, MALLS	Comparison of different techniques	124
EPC liposomes	not specified	200 mM NaCl	MALLS	Number weighted vesicle size distributions	125
EPC liposomes (encapsulated monomeric actin (G-actin))	not specified (10)	G-Buffer (5 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.2 mM CaCl ₂ , 0.2 mM ATP); F-buffer (50 mM KCl, 2 mM MgCl ₂ ,	MALLS	Effect of actin concentration and ionic strength of buffer on structure of actin- containing liposomes	126

S-6

EPC/DOPE liposomes (rhodamine B labeled)	RC (10)	1 mM ATP) 10 mM NaNO ₃ , 150 mM sucrose	UV (280, 571 nm), RI, MALLS	Influence of ionic strength and osmotic pressure on separation	127
EPC/POPC/PA/PI/PS/PG/cholesterol liposomes	RC (10)	8.5 mM phosphate buffer, pH 7.4	UV (254 nm)	Stability of liposomal formulations under different conditions	128
EPC/Sudan Red G liposomes; EPC/DOPE liposomes (rhodamine B labeled)	RC (10)	10 mM NaNO ₃	UV (280, 501, 571 nm) RI, MALLS	Influence of concentration and membrane adsorption phenomena	129
Lecithin liposomes (encapsulated THP-C11)	RC (5)	0.02% NaN ₃	MALLS		130
Lipobeads (DPPC/cholesterol/DCP/DiD as outer shell, NIPA/MBA/DEAP as core)	RC (10)	PBS (5 mM, 10 mM)	MALLS	Lipobeads prepared by microfluidics	131
PC/PG/cholesterol liposomes	RC (10)	PBS; Tris-HCl (various concentrations)	UV (254 nm), DLS	Influence of ionic strength and pH on separation	132
POPC/DMPC (PEGylated) liposomes, POPC/DSPC (PEGylated) liposomes	RC (10)	20 mM HEPES, pH 7.4	UV (254 nm)	Comparison to conventional methods	133
POPC/POPG liposomes, DPPC/DPPG liposomes (encapsulated temoporfin or cholesterol)	RC (5, 10)	0.02% NaN ₃	RI, MALLS	Correlation between selective drug partitioning and size	134
Proteoliposomes, synaptic vesicles	RC (10)	20 mM HEPES, pH 7.4, 150 mM KCl, 0.02% NaN ₃	DLS (offline)	Purification	135
SPC liposomes, EPC liposomes	RC (10)	NaNO ₃ (5, 10, 20, 50 mM)	UV (280 nm), RI, MALLS	Influence of fractionation parameters	136

^a Molar mass cut-off (MWCO) in kg·mol⁻¹.

Table 4: Proteins, viruses and virus-like-particles

Analyte	Membrane (MWCO) ^a	Eluent	Detection	Comment	Ref.
Acid phosphatase (APase)	RC	100 mM NaH ₂ PO ₄ , pH 4.3, pH 7.0	UV (227 nm)		137
Albumin, ferritin, hemoglobin, human and rat plasma, ovalbumin, γ-globulin	RC	20 mM PBS, 0.3% SDS, pH 7.2	UV	Fractionation of plasma, SDS induced structural formation of proteins	138
Alcohol dehydrogenase, apoferritin, BSA, carbonic anhydrase, cytochrome C	RC composite (10)	10 mM NH ₄ HCO ₃	UV (280 nm)	Two-dimensional separation by isoelectric focusing-AF4	139
Alcohol dehydrogenase, BSA, carbonic anhydrase, exosomes (from human mesenchymal stem cell line, B10), latex NP	RC composite (10)	0.1 M PBS, pH 7.4	UV (280 nm)	Miniaturized AF4	140
Aldolase, BSA, ferritin, β-lactoglobulin	RC (10)	10 mM phosphate buffer, pH 7.4	UV (280 nm)	Optimization of parameters	141
Algae (unicellular, different species), HSA (Fraction V), plasmids, sodium hyaluronate	RC (10, 30)	Tris-HNO ₃ , pH 7.4, 0.02% NaN ₃ , 1 mM EDTA	UV (260, 280, 420 nm), Fluorescence	Optimization of separation conditions	142
Amyloid Aβ ₁₋₄₂ peptide	PES (10)	1 mM phosphate buffer, pH 7.4, 0.02% SDS	UV (220 nm), MALLS	Time-dependent aggregation	143
Antibodies (IgG1)	RC (10)	0.1 M PBS, pH 6.5	UV (280 nm)	Separation of antibody-aggregates in comparison to SEC	144
Antibodies (IgG1)	RC (10)	various buffers	UV (280 nm),	Aggregation study	145

S-7

			MALLS		
Antibodies (IgG1)	RC (10)	100 mM phosphate buffer, pH 7.2, 100 mM Na ₂ SO ₄	UV (280 nm), Fluorescence, MALLS	Heat induced aggregation of IgG1	146
Antibodies (IgG1, IgG2), HAS	RC (10)	4 mM phosphate buffer at various pH, 135 mM NaCl	UV (215, 280 nm), RI, MALLS	Strength and stoichiometry of IgG binding to receptors	147
Antibodies (monoclonal)	RC (10)	10 mM sodium citrate, 100 mM NaCl, pH 5.5	UV (280 nm), RI, MALLS	Comparison of various methods for detection of protein aggregation	54
Antibody (IgG1), etanercept;	RC (10)	100 mM phosphate buffer, pH 7.2, 100 mM Na ₂ SO ₄	UV (280 nm), MALLS	Characterization and quantification of submicron protein aggregates	148
Apo ferritin, BSA, carbonic anhydrase, thyroglobulin	RC (10)	BSA: 50 mM NaCl; others: PBS	RI, MALLS	Combination of AF4 and HF5	149
Apo ferritin, BSA, ferritin, fibrinogen, xanthan gum	RC (10)	fibrinogen: 0.5 M KCl, 1 mM MgCl ₂ , 0.1 mM EDTA; xanthan: phosphate buffer, pH 6.5 (ionic strength 0.3 M); others: pure water	UV	Comparison of AF4 and analytical ultracentrifugation	150
Apo ferritin, γ-globulin, ovalbumin, thyroglobulin, transferrin	RC (30)	0.1 M Tris-HCl, pH 7.8	UV (280 nm)	Frit-Inlet AF4	151
Bacteriophages Qβ, MS2, f2, φX174, ferritin	RC	20 mM PBS, pH 7.1	UV		152
BSA	not specified (10)	not specified	UV, RI, MALLS,		153
BSA	RC (10)	8.5 mM phosphate buffer, pH 7.4, 150 mM NaCl	UV (280 nm), MALLS	Heat-induced BSA aggregation	154
BSA, ferritin, ovalbumin, pullulan, β-lactoglobulin	not specified (10)	0.05 M Tris, 0.1 M H ₃ PO ₄ , pH 7.5, 0.02% NaN ₃	RI	Calibration with proteins and pullulan	155
Carbonic anhydrase, ferritin, transferrin	RC (5, 10, 20); PES (10)	10 mM NH ₄ HCO ₃ , 0.02% NaN ₃	UV (280 nm), ESI-MS	Chip-type channel design; protein identification	156
Cow pea mosaic virus (CPMV), satellite tobacco necrosis virus (STNV)	RC (10), PLGC (10)	Tris-HNO ₃ , pH 7.5, 0.02% NaN ₃	UV	Influence of channel geometry	157
Cow pea mosaic virus (CPMV), human serum albumin (HAS) fraction V	RC (10)	different buffers at varying concentration	UV (280 nm)	Influence of carrier, temperature, sample load	158
Cytochrome c, ferritin, HSA (fraction V), plasmids, satellite tobacco necrosis virus (STNV), semliki forest virus (SFV), thyroglobulin	PLGC (10)	Tris-HNO ₃ , pH 7.4, 0.02% NaN ₃ , 1 mM EDTA	UV (260, 280 nm)	Optimization of separation conditions	159
Exosomes (from HB1.F3 human neural stem cells)	RC composite (10)	0.1 M PBS, pH 7.4	UV (280 nm)	Offline MS of protein fractions (proteasome analysis)	160
Fibroblast growth factor complex (FGF21/FGFR/β-Klotho)	not specified	4 mM phosphate buffer, various pH, 135 mM NaCl	UV (215, 280 nm), RI, MALLS		161
Glucagon	not specified (1, 10)	0.01 M HCl	UV (278 nm), MALLS	Glucagon aggregation as model for fibril formation	162
Granulocyte colony stimulating factor	RC (10)	50 mM NaNO ₃	UV (280 nm),		163

S-8

(PEGylated, PEG-G-CSF)		0.02% NaN ₃	RI, MALLS		
Green fluorescent protein inclusion bodies (GFPIBs)	RC (10)	0.04% FL-70	RI, MALLS		164
HDL, phospholipid transfer protein (PLTP), DPPC liposomes	RC (10)	10 mM phosphate buffer, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.02% NaN ₃ , pH 7.4	UV (254, 280 nm)	Separation after incubation	165
Hemoglobin (glycosylated)	not specified	not specified	RI, MALLS		166
Human plasma	RC (20)	10 mM NH ₄ HCO ₃	ESI-MS-MS	Top-down lipidomic analysis of human lipoproteins	167
Human plasma	RC (30)	Tris-HCl, pH 7.8	UV (280, 610 nm)	Role of lipoproteins for coronary artery disease	168
Human plasma	RC (10)	various buffers	UV (280 nm)	Miniaturized AF4	169
Human plasma	RC (10)	PBS, pH 7.4	UV (280 nm, 500 nm), MALLS	Dual online enzymatic determination of lipoprotein-cholesterol and lipoprotein-triglycerides	170
Human plasma	RC (10)	20 mM phosphate buffer, pH 7.4, 0.02% NaN ₃	UV (500 nm)	Dual online enzymatic determination of lipoprotein-cholesterol and lipoprotein-triglycerides	171
Human plasma	RC (10)	10 mM NH ₄ HCO ₃ , pH 8.2	UV (280 nm, 600 nm), Fluorescence	Application of a prior guard channel to deplete small plasma proteins	172
Human plasma	RC (10)	PBS, pH 7.4	UV (500 nm)	Determination of lipoprotein-cholesterol and lipoprotein-triglycerides by coupling AF4 and GC-MS	173
Human plasma	RC (30)	15 mM phosphate buffer, pH 7.2	UV (280, 600 nm), RI, MALLS	Size and shape characterization	174
Human plasma	not specified	PBS, pH 7.4	UV (280 nm)	Symmetric FFF	175
Human plasma, <i>N</i> -benzoyl-staurosporine	RC (3, 10)	36 mM PBS, pH 7.4, 100 mM NaCl, 0.001% NaN ₃ , 0.005% Tween® 80	UV (210 nm)	Drug transfer to plasma proteins: separation, adsorption and recovery	176
Human urine	RC composite (20)	10 mM NH ₄ HCO ₃	UV (280 nm)	Two-dimensional separation by isoelectric focusing-AF4	177
Influenza virus	RC (10)	0.1 M PBS, pH 7.4	MALLS	Setup optimization	178
Influenza virus (B/Yamanashi/166/98), adenovirus	RC (10); CTA (10)	not specified	MALLS	Aggregation of viruses	179
LDL	RC (10)	various PBS and acetate buffers	UV (280 nm)	Effect of oxidation on size distribution	180
Lipoproteins	RC (10)	9 mM phosphate buffer, pH 7.4, 140 mM NaCl	UV	Effect of sugars on lipoprotein structure	181
Lung cancer serum	RC (10)	1 mM CaCl ₂ , 1 mM MgCl ₂ , 1 mM MnCl ₂ , 50 mM TBS	UV (280 nm)	Lectin-based size sorting strategy to enrich glycopeptides	182
Pic gastric mucin	RC (10)	10 mM NaCl	RI, MALLS	Effect of pH on association behavior	183
PolyHb (glutaraldehyde cross-linked hemoglobin)	not specified	50 mM Tris, pH 7.2	RI, MALLS	Molar mass distribution	184-186
Prostatic cancer cell lysate (DU145 HRPC and PrEC cells), α-casein	RC composite (20)	10 mM NH ₄ HCO ₃	UV (280 nm)	Coupling of AF4 and isoelectric focusing	187
Prostatic cancer cell lysate (DU145 HRPC cells)	RC composite (10)	0.1 M PBS, pH 7.6	UV (254 nm)	Purification of cell lysates in supramicrometer range	188
Protease peptone component 3 (milk	not specified	5 mM Tris-HCl,	UV (205 nm),	Molar mass and size of	189

protein, PP3)	(10)	pH 7.5, 150 mM NaCl	RI, MALLS	tetrameric aggregates	
PrP ^{res} (protease-resistant PrP protein)	PES (10)	20 mM Tris, pH 7.0, 0.1% sodium n-undecyl sulphate (SUS)	RI, MALLS, DLS	Correlation of PrP aggregate size with infectivity and converting activity	190,191
<i>Pseudomonas putida</i> (P. putida, bacteria)	RC, PES	0.1 mM NaN ₃	UV (254 nm)	Investigation of biofouling of membranes	192
Qb VLP	RC, CTA, PES	20 mM phosphate buffer, pH 7.0, 150 mM NaCl	UV (260 nm), MALLS	Influence of various fractionation parameters	193,194
Ranibizumab (IgG fragment), bevacizumab (IgG)	not specified	various buffers	UV (280 nm), MALLS	Aggregation of mAbs	195
Trastuzumab (IgG1) antibody	PES (10)	0.9% NaCl; 5% dextrose	UV (280 nm), MALLS	Aggregation study	196
VLPs	RC (10)	20 mM phosphate buffer, pH 7.0, 150 mM NaCl	UV (260 nm), MALLS		197
VP1 VLP (derived from human polyoma JC-Virus)	RC (10)	20 mM Tris-HCl, pH 7.5, NaCl at various concentrations	UV, Fluorescence, RI, MALLS, DLS	Characterization of VLPs	198
VP1 VLP (derived from murine polyoma virus)	RC (10)	various buffers	UV (280 nm), RI, MALLS		199
VP1 VLP (derived from murine polyoma virus)	not specified	lysis-buffer	UV	Modeling impact of aggregates on chromatographic performance	200
VP1 VLP (derived from murine polyoma virus)	not specified	10 mM Tris, 50 mM NaCl, 0.01 mM CaCl ₂ , pH 8.0	UV, MALLS	Quantification of VP1-VLP	201
VP1 VLP (derived from murine polyoma virus)	RC (10)	lysis-buffer	UV (280 nm), RI, MALLS		202
VP2 VLP (derived from murine polyoma virus)	not specified (10)	lysis-buffer	UV (280 nm), MALLS	Effect of encapsulation on the structure of VLPs	203

^a Molar mass cut-off (MWCO) in kg·mol⁻¹.

References

- (1) Frank, K. J.; Westedt, U.; Rosenblatt, K. M.; Hölig, P.; Rosenberg, J.; Mägerlein, M.; Fricker, G.; Brandl, M. *Int. J. Nanomedicine* **2012**, *7*, 5757-5768.
- (2) Isaacson, C.; Zhang, W.; Powell, T.; Ma, X.; Bouchard, D. *Environ. Sci. Technol.* **2011**, *45*, 5170-5177.
- (3) Isaacson, C. W.; Bouchard, D. C. *Environ. Sci. Technol.* **2010**, *44*, 8971-8976.
- (4) Isaacson, C. W.; Bouchard, D. *J. Chromatogr. A* **2010**, *1217*, 1506-1512.
- (5) Kato, H.; Shinohara, N.; Nakamura, A.; Horie, M.; Fujita, K.; Takahashi, K.; Iwahashi, H.; Endoh, S.; Kinugasa, S. *Mol. Biosyst.* **2010**, *6*, 1238-1246.
- (6) Gigault, J.; Le Hecho, I.; Dubascoux, S.; Potin-Gautier, M.; Lespes, G. *J. Chromatogr. A* **2010**, *1217*, 7891-7897.
- (7) Al-Hajaj, N. A.; Moquin, A.; Neibert, K. D.; Soliman, G. M.; Winnik, F. M.; Maysinger, D. *ACS Nano* **2011**, *5*, 4909-4918.
- (8) Lee, S.; Kim, K.; Shon, H. K.; Kim, S. D.; Cho, J. *J. Nanopart. Res.* **2011**, *13*, 3051-3061.
- (9) Guan, X.; Cueto, R.; Russo, P.; Qi, Y.; Wu, Q. *Biomacromolecules* **2012**, *13*, 2671-9.
- (10) Fraunhofer, W.; Winter, G.; Coester, C. *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 1909-1920.
- (11) Zillies, J. C.; Zworek, K.; Winter, G.; Coester, C. *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 4574-4580.
- (12) Schultes, S.; Mathis, K.; Zillies, J.; Zworek, K.; Coester, C.; Winter, G. *Lc Gc Europe* **2009**, *22*, 390-403.
- (13) Gigault, J.; Cho, T. J.; MacCusprie, R. I.; Hackley, V. A. *Anal. Bioanal. Chem.* **2013**, *405*, 1191-1202.
- (14) Runyon, J. R.; Goering, A.; Yong, K. T.; Williams, S. K. *Anal. Chem.* **2013**, *85*, 940-8.
- (15) Cho, T. J.; Hackley, V. A. *Anal. Bioanal. Chem.* **2010**, *398*, 2003-2018.

- (16) Tsai, D.-H.; DelRio, F. W.; Keene, A. M.; Tyner, K. M.; MacCuspie, R. I.; Cho, T. J.; Zachariah, M. R.; Hackley, V. A. *Langmuir* **2011**, *27*, 2464-2477.
- (17) Calzolari, L.; Gilliland, D.; Garcia, C. P.; Rossi, F. *J. Chromatogr. A* **2011**, *1218*, 4234-4239.
- (18) Hagendorfer, H.; Kaegi, R.; Traber, J.; Mertens, S. F. L.; Scherrers, R.; Ludwig, C.; Ulrich, A. *Anal. Chim. Acta* **2011**, *706*, 367-378.
- (19) Gray, E. P.; Bruton, T. A.; Higgins, C. P.; Halden, R. U.; Westerhoff, P.; Ranville, J. F. *J. Anal. At. Spectrom.* **2012**, *27*, 1532-1539.
- (20) Lemke, K.; Prietzel, C.; Koetz, J. *J. Colloid Interface Sci.* **2013**, *394*, 141-146.
- (21) Schmidt, B.; Loeschner, K.; Hadrup, N.; Mortensen, A.; Sloth, J. J.; Koch, C. B.; Larsen, E. H. *Anal. Chem.* **2011**, *83*, 2461-2468.
- (22) Tsai, D.-H.; Cho, T. J.; DelRio, F. W.; Taurozzi, J.; Zachariah, M. R.; Hackley, V. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 8884-8887.
- (23) Zattoni, A.; Rambaldi, D. C.; Reschiglian, P.; Melucci, M.; Krol, S.; Garcia, A. M. C.; Sanz-Medel, A.; Roessner, D.; Johann, C. *J. Chromatogr. A* **2009**, *1216*, 9106-9112.
- (24) Ulrich, A.; Losert, S.; Bendixen, N.; Al-Kattan, A.; Hagendorfer, H.; Nowack, B.; Adlhart, C.; Ebert, J.; Lattuada, M.; Hungerbühler, K. *J. Anal. At. Spectrom.* **2012**, *27*, 1120-1130.
- (25) Knappe, P.; Boehmert, L.; Bienert, R.; Karmutzki, S.; Niemann, B.; Lampen, A.; Thünemann, A. F. *J. Chromatogr. A* **2011**, *1218*, 4160-4166.
- (26) Belete, A.; Mäder, K. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **2013**, *39*, 186-196.
- (27) Thünemann, A. F.; Kegel, J.; Polte, J.; Emmerling, F. *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 5905-5911.
- (28) Lohrke, J.; Briel, A.; Mäder, K. *Nanomed.* **2008**, *3*, 437-452.
- (29) Dutz, S.; Kuntsche, J.; Eberbeck, D.; Müller, R.; Zeisberger, M. *Nanotechnology* **2012**, *23*.
- (30) Thünemann, A. F.; Rolf, S.; Knappe, P.; Weidner, S. *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 296-301.
- (31) Frankema, W.; van Bruijnsvoort, M.; Tijssen, R.; Kok, W. T. *J. Chromatogr. A* **2002**, *943*, 251-261.
- (32) Ratanathanawongs, S. K.; Shiundu, P. M.; Giddings, J. C. *Colloids Surf., A* **1995**, *105*, 243-250.
- (33) Giddings, J. C.; Chen, X. R.; Wahlund, K. G.; Myers, M. N. *Anal. Chem.* **1987**, *59*, 1957-1962.
- (34) Botana, A. M.; Ratanathanawongs, S. K.; Giddings, J. C. *J. Microcolumn Sep.* **1995**, *7*, 395-402.
- (35) Roessner, D.; Kulicke, W. M. *J. Chromatogr. A* **1994**, *687*, 249-258.
- (36) Thang, N. M.; Knopp, R.; Geckeis, H.; Kim, J. I.; Beck, H. P. *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 1-5.
- (37) Lang, T.; Eslahian, K. A.; Maskos, M. *Macromol. Chem. Phys.* **2012**, *213*, 2353-2361.
- (38) Lattuada, M.; Olivo, C.; Gauer, C.; Storti, G.; Morbidelli, M. *Langmuir* **2010**, *26*, 7062-7071.
- (39) Thielking, H.; Roessner, D.; Kulicke, W. M. *Anal. Chem.* **1995**, *67*, 3229-3233.
- (40) Thielking, H.; Kulicke, W. M. *J. Microcolumn Sep.* **1998**, *10*, 51-56.
- (41) Kang, D. Y.; Kim, M. J.; Kim, S. T.; Oh, K. S.; Yuk, S. H.; Lee, S. *Anal. Bioanal. Chem.* **2008**, *390*, 2183-2188.
- (42) Zhang, J.; Haas, R. M.; Leone, A. M. *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 6088-6096.
- (43) Kanzer, J.; Hupfeld, S.; Vasskog, T.; Tho, I.; Hoelig, P.; Mägerlein, M.; Fricker, G.; Brandl, M. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2010**, *53*, 359-365.
- (44) Prestel, H.; Niessner, R.; Panne, U. *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 6664-6669.
- (45) Moon, M. H.; Kim, K.; Byun, Y.; Pyo, D. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **1999**, *22*, 2729-2740.
- (46) Schädlich, A.; Caysa, H.; Mueller, T.; Tenamberg, F.; Rose, C.; Göpferich, A.; Kuntsche, J.; Mäder, K. *ACS Nano* **2011**, *5*, 8710-8720.
- (47) Schädlich, A.; Rose, C.; Kuntsche, J.; Caysa, H.; Mueller, T.; Göpferich, A.; Mäder, K. *Pharm. Res.* **2011**, *28*, 1995-2007.
- (48) Robinson, H. C.; Horner, A. A.; Hook, M.; Ogren, S.; Lindahl, U. *J. Biol. Chem.* **1978**, *253*, 6687-93.
- (49) Augsten, C.; Kiselev, M. A.; Gehrke, R.; Hause, G.; Mäder, K. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2008**, *47*, 95-102.
- (50) Suresh, K. I.; Bartsch, E. *J. Appl. Polym. Sci.* **2013**, *127*, 208-216.
- (51) Blackburn, W. H.; Lyon, L. A. *Colloid Polym. Sci.* **2008**, *286*, 563-569.
- (52) Gaulding, J. C.; South, A. B.; Lyon, L. A. *Colloid Polym. Sci.* **2013**, *291*, 99-107.
- (53) Blackburn, W. H.; Dickerson, E. B.; Smith, M. H.; McDonald, J. F.; Lyon, L. A. *Bioconjugate Chem.* **2009**, *20*, 960-968.

- (54) Smith, M. H.; South, A. B.; Gaulding, J. C.; Lyon, L. A. *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 523-530.
- (55) Utech, S.; Scherer, C.; Krohne, K.; Carrella, L.; Rentschler, E.; Gasi, T.; Ksenofontov, V.; Felser, C.; Maskos, M. *J. Magn. Magn. Mater.* **2010**, *322*, 3519-3526.
- (56) Noskov, S.; Scherer, C.; Maskos, M. *J. Chromatogr. A* **2013**, *1274*, 151-8.
- (57) Jungmann, N.; Schmidt, M.; Maskos, M. *Macromolecules* **2001**, *34*, 8347-8353.
- (58) Jungmann, N.; Schmidt, M.; Maskos, M.; Weis, J.; Ebenhoch, J. *Macromolecules* **2002**, *35*, 6851-6857.
- (59) Shimoda, A.; Sawada, S.; Kano, A.; Maruyama, A.; Moquin, A.; Winnik, F. M.; Akiyoshi, K. *Colloids Surf., B* **2012**, *99*, 38-44.
- (60) Soto-Cantu, E.; Cueto, R.; Koch, J.; Russo, P. S. *Langmuir* **2012**, *28*, 5562-5569.
- (61) Melucci, M.; Zambianchi, M.; Barbarella, G.; Manet, I.; Montalti, M.; Bonacchi, S.; Rampazzo, E.; Rambaldi, D. C.; Zattoni, A.; Reschiglian, P. *J. Mater. Chem.* **2010**, *20*, 9903-9909.
- (62) Xu, H.; Yan, F.; Monson, E. E.; Kopelman, R. *J. Biomed. Mater. Res., Part A* **2003**, *66A*, 870-879.
- (63) Loeschner, K.; Navratilova, J.; Legros, S.; Wagner, S.; Grombe, R.; Snell, J.; von der Kammer, F.; Larsen, E. H. *J. Chromatogr. A* **2013**, *1272*, 116-125.
- (64) Hagendorfer, H.; Kaegi, R.; Parlinska, M.; Sinnet, B.; Ludwig, C.; Ulrich, A. *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 2678-2685.
- (65) Bolea, E.; Jimenez-Lamana, J.; Laborda, F.; Castillo, J. R. *Anal. Bioanal. Chem.* **2011**, *401*, 2723-2732.
- (66) Delay, M.; Dolt, T.; Woellhaf, A.; Sembritzki, R.; Frimmel, F. H. *J. Chromatogr. A* **2011**, *1218*, 4206-4212.
- (67) Pettibone, J. M.; Gigault, J.; Hackley, V. A. *ACS Nano* **2013**, *7*, 2491-2499.
- (68) Gigault, J.; Hackley, V. A. *Anal. Chim. Acta* **2013**, *763*, 57-66.
- (69) Hoque, M. E.; Khosravi, K.; Newman, K.; Metcalfe, C. D. *J. Chromatogr. A* **2012**, *1233*, 109-115.
- (70) Mitrano, D. M.; Barber, A.; Bednar, A.; Westerhoff, P.; Higgins, C. P.; Ranville, J. F. *J. Anal. At. Spectrom.* **2012**, *27*, 1131-1142.
- (71) Unrine, J. M.; Colman, B. P.; Bone, A. J.; Gondikas, A. P.; Matson, C. W. *Environ. Sci. Technol.* **2012**, *46*, 6915-6924.
- (72) Dieckmann, Y.; Cölfen, H.; Hofmann, H.; Petri-Fink, A. *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 3889-3895.
- (73) Loos, K.; Boker, A.; Zettl, H.; Zhang, A. F.; Krausch, G.; Müller, A. H. E. *Macromolecules* **2005**, *38*, 873-879.
- (74) Augsten, C.; Mäder, K. *Int. J. Pharm.* **2008**, *351*, 23-30.
- (75) Mao, S.; Augsten, C.; Mäder, K.; Kissel, T. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2007**, *45*, 736-741.
- (76) Ma, P. L.; Buschmann, M.; Winnik, F. M. *Abstr. Pap. Am. Chem. Soc.* **2010**, *240*.
- (77) Ma, P. L.; Buschmann, M. D.; Winnik, F. M. *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 9636-9643.
- (78) Ma, P. L.; Buschmann, M. D.; Winnik, F. M. *Biomacromolecules* **2010**, *11*, 549-554.
- (79) Kirkland, J. J.; Dilks, C. H.; Rementer, S. W. *Anal. Chem.* **1992**, *64*, 1295-1303.
- (80) Viebke, C.; Williams, P. A. *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 3896-3901.
- (81) Wittgren, B.; Wahlund, K. G. *J. Chromatogr. A* **1997**, *760*, 205-218.
- (82) Andersson, M.; Wittgren, B.; Wahlund, K. G. *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 4852-4861.
- (83) Andersson, M.; Wittgren, B.; Schagerlof, H.; Momcilovic, D.; Wahlund, K. G. *Biomacromolecules* **2004**, *5*, 97-105.
- (84) Tan, J. S.; Harrison, C. A.; Li, J. T.; Caldwell, K. D. *J. Polym. Sci., Part B: Polym. Phys.* **1998**, *36*, 537-542.
- (85) Boye, S.; Polikarpov, N.; Appelhans, D.; Lederer, A. *J. Chromatogr. A* **2010**, *1217*, 4841-4849.
- (86) Lederer, A.; Boye, S. *Lc Gc Europe* **2011**, *24*, 620-628.
- (87) Boye, S.; Appelhans, D.; Boyko, V.; Zschoche, S.; Komber, H.; Friedel, P.; Formanek, P.; Janke, A.; Voit, B. I.; Lederer, A. *Biomacromolecules* **2012**, *13*, 4222-4235.
- (88) Benincasa, M. A.; Caldwell, K. D. *J. Chromatogr. A* **2001**, *925*, 159-169.
- (89) Hasselov, M.; Hulthe, G.; Lyven, B.; Stenhagen, G. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **1997**, *20*, 2843-2856.
- (90) Petrov, P. D.; Drechsler, M.; Müller, A. H. E. *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 4218-4225.

- (91) Knop, K.; Mingotaud, A.-F.; El-Akra, N.; Violleau, F.; Souchard, J.-P. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2009**, *8*, 396-404.
- (92) Ehrhart, J.; Mingotaud, A.-F.; Violleau, F. *J. Chromatogr. A* **2011**, *1218*, 4249-4256.
- (93) Miller, T.; Rachel, R.; Besheer, A.; Uezguen, S.; Weigandt, M.; Göpferich, A. *Pharm. Res.* **2012**, *29*, 448-459.
- (94) Benincasa, M. A.; Giddings, J. C. *J. Microcolumn Sep.* **1997**, *9*, 479-495.
- (95) Knappe, P.; Bienert, R.; Weidner, S.; Thünemann, A. F. *Macromol. Chem. Phys.* **2010**, *211*, 2148-2153.
- (96) Lee, S.; Kwen, H. D.; Lee, S. K.; Nehete, S. V. *Anal. Bioanal. Chem.* **2010**, *396*, 1581-1588.
- (97) Muthukrishnan, S.; Plamper, F.; Mori, H.; Müller, A. H. E. *Macromolecules* **2005**, *38*, 10631-10642.
- (98) Yohannes, G.; Holappa, S.; Wiedmer, S. K.; Andersson, T.; Tenhu, H.; Riekkola, M.-L. *Anal. Chim. Acta* **2005**, *542*, 222-229.
- (99) Glinel, K.; Vaugelade, C.; Muller, G.; Bunel, C. *Int. J. Polym. Anal. Charact.* **2000**, *6*, 89-107.
- (100) Yohannes, G.; Shan, J.; Jussila, M.; Nuopponen, M.; Tenhu, H.; Riekkola, M.-L. *J. Sep. Sci.* **2005**, *28*, 435-442.
- (101) Wittgren, B.; Wahlund, K. G.; Derand, H.; Wesslen, B. *Macromolecules* **1996**, *29*, 268-276.
- (102) Wittgren, B.; Wahlund, K. G.; Derand, H.; Wesslen, B. *Langmuir* **1996**, *12*, 5999-6005.
- (103) Le Cerf, D.; Simon, S.; Argillier, J.-F.; Picton, L. *Anal. Chim. Acta* **2007**, *604*, 2-8.
- (104) Thielking, H.; Kulicke, W. M. *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 1169-1173.
- (105) Tank, C.; Antonietti, M. *Macromol. Chem. Phys.* **1996**, *197*, 2943-2959.
- (106) Adolphi, U.; Kulicke, W. M. *Polymer* **1997**, *38*, 1513-1519.
- (107) Jiang, Y.; Miller, M. E.; Li, P.; Hansen, M. E. *Am. Lab.* **2000**, *32*, 98-99.
- (108) Knappe, P.; Bienert, R.; Weidner, S.; Thünemann, A. F. *Polymer* **2010**, *51*, 1723-1727.
- (109) Noga, M.; Edinger, D.; Klager, R.; Wegner, S. V.; Spatz, J. P.; Wagner, E.; Winter, G.; Besheer, A. *Biomaterials* **2013**, *34*, 2530-8.
- (110) Bourgoïn, A.; Zabackis, E.; Poli, J. B. *Food Hydrocolloids* **2008**, *22*, 1607-1611.
- (111) Wittgren, B.; Borgstrom, J.; Piculell, L.; Wahlund, K. G. *Biopolymers* **1998**, *45*, 85-96.
- (112) Viebke, C.; Williams, P. A. *Food Hydrocolloids* **2000**, *14*, 265-270.
- (113) Reiner, J. E.; Jahn, A.; Stavis, S. M.; Culbertson, M. J.; Vreeland, W. N.; Burden, D. L.; Geist, J.; Gaitan, M. *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 180-188.
- (114) Jahn, A.; Vreeland, W. N.; DeVoe, D. L.; Locascio, L. E.; Gaitan, M. *Langmuir* **2007**, *23*, 6289-6293.
- (115) Arifin, D. R.; Palmer, A. F. *Biotechnol. Prog.* **2003**, *19*, 1798-1811.
- (116) Arifin, D. R.; Palmer, A. F. *Artif. Cells Blood Substit. Biotechnol.* **2005**, *33*, 113-136.
- (117) Li, S. L.; Nickels, J.; Palmer, A. F. *Biomaterials* **2005**, *26*, 3759-3769.
- (118) Yohannes, G.; Wiedmer, S. K.; Tuominen, E. K. J.; Kinnunen, P. K. J.; Riekkola, M.-L. *Anal. Bioanal. Chem.* **2004**, *380*, 757-766.
- (119) Evjen, T. J.; Hupfeld, S.; Barnert, S.; Fossheim, S.; Schubert, R.; Brandl, M. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2013**, *78-79*, 118-22.
- (120) Lee, H.; Williams, S. K.; Allison, S. D.; Anchordoquy, T. J. *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 837-43.
- (121) Kuntsche, J.; Decker, C.; Fahr, A. *J. Sep. Sci.* **2012**, *35*, 1993-2001.
- (122) Moon, M. H.; Giddings, J. C. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1993**, *11*, 911-920.
- (123) Vainikka, K.; Reijmar, K.; Yohannes, G.; Samuelsson, J.; Edwards, K.; Jussila, M.; Riekkola, M.-L. *Anal. Biochem.* **2011**, *414*, 117-124.
- (124) Hupfeld, S.; Holsaeter, A. M.; Skar, M.; Frantzen, C. B.; Brandl, M. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2006**, *6*, 3025-3031.
- (125) Korgel, B. A.; van Zanten, J. H.; Monbouquette, H. G. *Biophys. J.* **1998**, *74*, 3264-3272.
- (126) Li, S.; Palmer, A. F. *Langmuir* **2004**, *20*, 4629-4639.
- (127) Hupfeld, S.; Moen, H. H.; Ausbacher, D.; Haas, H.; Brandl, M. *Chem. Phys. Lipids* **2010**, *163*, 141-147.

- (128) Yohannes, G.; Pystynen, K. H.; Riekkola, M.-L.; Wiedmer, S. K. *Anal. Chim. Acta* **2006**, *560*, 50-56.
- (129) Hupfeld, S.; Ausbacher, D.; Brandl, M. J. *Sep. Sci.* **2009**, *32*, 3555-3561.
- (130) Kaluderovic, G. N.; Dietrich, A.; Kommera, H.; Kuntsche, J.; Mäder, K.; Mueller, T.; Paschke, R. *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, *54*, 567-572.
- (131) Hong, J. S.; Stavis, S. M.; Lacerda, S. H. D.; Locascio, L. E.; Raghavan, S. R.; Gaitan, M. *Langmuir* **2010**, *26*, 11581-11588.
- (132) Moon, M. H.; Park, I.; Kim, Y. H. *J. Chromatogr. A* **1998**, *813*, 91-100.
- (133) Linden, M. V.; Meinander, K.; Hellel, A.; Yohannes, G.; Riekkola, M.-L.; Butcher, S. J.; Viitala, T.; Wiedmer, S. K. *Electrophoresis* **2008**, *29*, 852-862.
- (134) Decker, C.; Fahr, A.; Kuntsche, J.; May, S. *Chem. Phys. Lipids* **2012**, *165*, 520-529.
- (135) Castorph, S.; Henriques, S. S.; Holt, M.; Riedel, D.; Jahn, R.; Salditt, T. *Eur. Phys. J. E* **2011**, *34*.
- (136) Hupfeld, S.; Ausbacher, D.; Brandl, M. J. *Sep. Sci.* **2009**, *32*, 1465-1470.
- (137) Litzén, A.; Garn, M. B.; Widmer, H. M. *J. Biotechnol.* **1994**, *37*, 291-295.
- (138) Giddings, J. C.; Yang, F. J.; Myers, M. N. *Anal. Biochem.* **1977**, *81*, 395-407.
- (139) Kim, K. H.; Moon, M. H. *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 1715-1721.
- (140) Oh, S.; Kang, D.; Ahn, S.-M.; Simpson, R. J.; Lee, B.-H.; Moon, M. H. *J. Sep. Sci.* **2007**, *30*, 1082-1087.
- (141) Qureshi, R. N.; Kok, W. T. *Lc Gc Europe* **2010**, *23*, 18-25.
- (142) Wahlund, K. G.; Litzén, A. *J. Chromatogr.* **1989**, *461*, 73-87.
- (143) Rambaldi, D. C.; Zattoni, A.; Reschiglian, P.; Colombo, R.; De Lorenzi, E. *Anal. Bioanal. Chem.* **2009**, *394*, 2145-2149.
- (144) Litzén, A.; Walter, J. K.; Krischollek, H.; Wahlund, K. G. *Anal. Biochem.* **1993**, *212*, 469-480.
- (145) Weber, C.; Wagner, M.; Baykal, D.; Höppener, S.; Paulus, R. M.; Festag, G.; Altuntas, E.; Schacher, F. H.; Schubert, U. S. *Macromolecules* **2013**, *46*, 5107-5116.
- (146) Wagner, M.; Reiche, K.; Blume, A.; Garidel, P. *Pharm. Dev. Technol.* **2013**, *18*, 963-970.
- (147) Pollastrini, J.; Dillon, T. M.; Bondarenko, P.; Chou, R. Y. T. *Anal. Biochem.* **2011**, *414*, 88-98.
- (148) Hawe, A.; Romeijn, S.; Filipe, V.; Jiskoot, W. J. *Pharm. Sci.* **2012**, *101*, 4129-4139.
- (149) Johann, C.; Elsenberg, S.; Roesch, U.; Rambaldi, D. C.; Zattoni, A.; Reschiglian, P. *J. Chromatogr. A* **2011**, *1218*, 4126-4131.
- (150) Pauck, T.; Cölfen, H. *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 3886-3891.
- (151) Moon, M. H.; Kwon, H.; Park, I. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **1997**, *20*, 2803-2814.
- (152) Giddings, J. C.; Yang, F. J.; Myers, M. N. *J. Virol.* **1977**, *21*, 131-138.
- (153) Johann, C.; Ramage, P.; Hemmig, R. *Lc Gc Europe* **2005**, *18*, 535-538.
- (154) Yohannes, G.; Wiedmer, S. K.; Elomaa, M.; Jussila, M.; Aseyev, V.; Riekkola, M.-L. *Anal. Chim. Acta* **2010**, *675*, 191-198.
- (155) Ji, E.; Choi, S.-H.; Yoon, K. R.; Chun, J.-H.; Lee, S. *Bull. Korean Chem. Soc.* **2006**, *27*, 1433-1438.
- (156) Kim, K. H.; Moon, M. H. *Anal. Chem.* **2011**, *83*, 8652-8658.
- (157) Litzén, A.; Wahlund, K. G. *Anal. Chem.* **1991**, *63*, 1001-1007.
- (158) Litzén, A.; Wahlund, K. G. *J. Chromatogr.* **1991**, *548*, 393-406.
- (159) Litzén, A.; Wahlund, K. G. *J. Chromatogr.* **1989**, *476*, 413-421.
- (160) Kang, D.; Oh, S.; Ahn, S.-M.; Lee, B.-H.; Moon, M. H. *J. Proteome Res.* **2008**, *7*, 3475-3480.
- (161) Yie, J.; Wang, W.; Deng, L.; Tam, L.-T.; Stevens, J.; Chen, M. M.; Li, Y.; Xu, J.; Lindberg, R.; Hecht, R.; Veniant, M.; Chen, C.; Wang, M. *Chem. Biol. Drug Des.* **2012**, *79*, 398-410.
- (162) Hoppe, C. C.; Nguyen, L. T.; Kirsch, L. E.; Wiencek, J. M. *J. Biol. Eng.* **2008**, *2*, 10.
- (163) Rebolj, K.; Pahovnik, D.; Zagar, E. *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 7374-83.
- (164) Luo, J.; Leeman, M.; Ballagi, A.; Elfving, A.; Su, Z. G.; Janson, J. C.; Wahlund, K. G. *J. Chromatogr. A* **2006**, *1120*, 158-164.
- (165) Setälä, N. L.; Holopainen, J. M.; Metso, J.; Wiedmer, S. K.; Yohannes, G.; Kinnunen, P. K. J.; Ehnholm, C.; Jauhiainen, M. *Biochemistry* **2007**, *46*, 1312-1319.
- (166) Zhang, Y.; Bhatt, V. S.; Sun, G.; Wang, P. G.; Palmer, A. F. *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19*, 2221-2230.

- (167) Kim, K. H.; Lee, J. Y.; Lim, S.; Moon, M. H. *J. Chromatogr. A* **2013**, *1280*, 92-7.
- (168) Park, I.; Paeng, K. J.; Yoon, Y.; Song, J. H.; Moon, M. H. *J. Chromatogr. B* **2002**, *780*, 415-422.
- (169) Yohannes, G.; Sneck, M.; Varjo, S. J.; Jussila, M.; Wiedmer, S. K.; Kovanen, P. T.; Oorni, K.; Riekkola, M.-L. *Anal. Biochem.* **2006**, *354*, 255-265.
- (170) Qureshi, R. N.; Kok, W. T.; Schoenmakers, P. J. *Anal. Chim. Acta* **2009**, *654*, 85-91.
- (171) Rambaldi, D. C.; Reschiglian, P.; Zattoni, A.; Johann, C. *Anal. Chim. Acta* **2009**, *654*, 64-70.
- (172) Lee, J. Y.; Choi, D.; Johan, C.; Moon, M. H. *J. Chromatogr. A* **2011**, *1218*, 4144-4148.
- (173) Qureshi, R. N.; Kaal, E.; Janssen, H.-G.; Schoenmakers, P. J.; Kok, W. T. *Anal. Chim. Acta* **2011**, *706*, 361-366.
- (174) Rambaldi, D. C.; Zattoni, A.; Casolari, S.; Reschiglian, P.; Roessner, D.; Johann, C. *Clin. Chem.* **2007**, *53*, 2026-2029.
- (175) Li, P.; Hansen, M.; Giddings, J. C. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **1997**, *20*, 2777-2802.
- (176) Madorin, M.; van Hoogevest, P.; Hilfiker, R.; Langwost, B.; Kresbach, G. M.; Ehrat, M.; Leuenberger, H. *Pharm. Res.* **1997**, *14*, 1706-1712.
- (177) Kim, K. H.; Moon, M. H. *J. Proteome Res.* **2009**, *8*, 4272-4278.
- (178) Wei, Z.; McEvoy, M.; Razinkov, V.; Polozova, A.; Li, E.; Casas-Finet, J.; Tous, G. I.; Balu, P.; Pan, A. A.; Mehta, H.; Schenerman, M. A. *J. Virol. Methods* **2007**, *144*, 122-132.
- (179) McEvoy, M.; Razinkov, V.; Wei, Z. P.; Casas-Finet, J. R.; Tous, G. I.; Schenerman, M. A. *Biotechnol. Prog.* **2011**, *27*, 547-554.
- (180) Kuldvee, R.; D'Ulivo, L.; Yohannes, G.; Lindenburg, P. W.; Laine, M.; Oorni, K.; Kovanen, P.; Riekkola, M.-L. *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 2665-2671.
- (181) Witos, J.; Cilpa, G.; Yohannes, G.; Oorni, K.; Kovanen, P. T.; Jauhiainen, M.; Riekkola, M.-L. *J. Sep. Sci.* **2010**, *33*, 2528-2535.
- (182) Kim, J. Y.; Kim, S.-K.; Kang, D.; Moon, M. H. *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 5343-5350.
- (183) Maleki, A.; Lafitte, G.; Kjoniksen, A.-L.; Thuresson, K.; Nystrom, B. *Carbohydr. Res.* **2008**, *343*, 328-340.
- (184) Eike, J. H.; Palmer, A. F. *Biotechnol. Prog.* **2004**, *20*, 1225-1232.
- (185) Eike, J. H.; Palmer, A. F. *Biotechnol. Prog.* **2004**, *20*, 946-952.
- (186) Eike, J. H.; Palmer, A. F. *Biotechnol. Prog.* **2004**, *20*, 953-962.
- (187) Kim, K. H.; Kim, J. Y.; Kim, M. O.; Moon, M. H. *J. Proteomics* **2012**, *75*, 2297-2305.
- (188) Kang, D.; Yoo, J. S.; Kim, M. O.; Moon, M. H. *J. Proteome Res.* **2009**, *8*, 982-991.
- (189) Pedersen, L. R. L.; Nielsen, S. B.; Hansted, J. G.; Petersen, T. E.; Otzen, D. E.; Sorensen, E. S. *FEBS J.* **2012**, *279*, 336-347.
- (190) Silveira, J. R.; Raymond, G. J.; Hughson, A. G.; Race, R. E.; Sim, V. L.; Hayes, S. F.; Caughey, B. *Nature* **2005**, *437*, 257-261.
- (191) Silveira, J. R.; Hughson, A. G.; Caughey, B. *Method Enzymol* **2006**, *412*, 21-33.
- (192) Lim, S. B.; Lee, S. Y.; Choi, S.; Moon, J.; Hong, S. K. *Desalination* **2010**, *264*, 236-242.
- (193) Panyam, J.; Dali, M. M.; Sahoo, S. K.; Ma, W.; Chakravarthi, S. S.; Amidon, G. L.; Levy, R. J.; Labhasetwar, V. *J. Control. Release* **2003**, *92*, 173-187.
- (194) Lang, R.; Winter, G.; Vogt, L.; Zürcher, A.; Dorigo, B.; Schimmele, B. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **2009**, *35*, 83-97.
- (195) Veurink, M.; Stella, C.; Tabatabay, C.; Pournaras, C. J.; Gurny, R. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2011**, *78*, 271-277.
- (196) Demeule, B.; Palais, C.; Machaidze, G.; Gurny, R.; Arvinte, T. *mAbs* **2009**, *1*, 142-150.
- (197) Lang, R.; Vogt, L.; Zürcher, A.; Winter, G. *Am. Lab.* **2010**, *42*, 13-15.
- (198) Citkowitz, A.; Petry, H.; Harkins, R. N.; Ast, O.; Cashion, L.; Goldmarm, C.; Bringmarm, P.; Plummer, K.; Larsen, B. R. *Anal. Biochem.* **2008**, *376*, 163-172.
- (199) Miklautz, H.; Riemann, J.; Vidic, H. J. *J. Liq. Chromatogr.* **1986**, *9*, 2073-93.
- (200) Lipin, D. I.; Raj, A.; Lua, L. H. L.; Middelberg, A. P. J. *J. Chromatogr. A* **2009**, *1216*, 5696-5708.
- (201) Pease, L. F., III; Lipin, D. I.; Tsai, D.-H.; Zachariah, M. R.; Lua, L. H. L.; Tarlov, M. J.; Middelberg, A. P. J. *Biotechnol. Bioeng.* **2009**, *102*, 845-855.
- (202) Lipin, D. I.; Lua, L. H. L.; Middelberg, A. P. J. *J. Chromatogr. A* **2008**, *1190*, 204-214.

(203) Lipin, D. I.; Chuan, Y. P.; Lua, L. H. L.; Middelberg, A. P. J. *Arch. Virol.* **2008**, *153*, 2027-2039.

2.3 Veröffentlichung 2

Quantitative *In Vitro* Assessment of Liposome Stability and Drug Transfer Employing Asymmetrical Flow Field-Flow Fractionation (AF4).

Stephan Holzschuh, Kathrin Kaeß, Alfred Fahr, Christiane Decker;

Publiziert in: Pharmaceutical Research
Akzeptiert: 16. November 2015
Online: 23. November 2015
DOI: 10.1007/s11095-015-1831-y
Printversion: April 2016, Volume 33, Issue 4, S. 842-855

This is an author's accepted manuscript of an article published by Springer in Pharm Res 2016, 33, 842-855 in its revised and accepted form; a postprint printed with permission of Springer. Copyright to the final published article belongs to Springer Science+Business Media, Copyright 2015.

It has been published online first in Pharmaceutical Research, November 23, 2015. The final publication is available at Springer via <http://link.springer.com/10.1007%2Fs11095-015-1831-y>.

Quantitative *in vitro* assessment of liposome stability and drug transfer employing asymmetrical flow field-flow fractionation (AF4)

Stephan Holzschuh¹, Kathrin Kaeß¹, Alfred Fahr¹, Christiane Decker^{1*}

¹ Friedrich Schiller University Jena, Department of Pharmaceutical Technology,
Lessingstraße 8, D-07743 Jena, Germany

* Corresponding author: Friedrich Schiller University Jena, Department of Pharmaceutical Technology, Lessingstraße 8, D-07743 Jena, Germany, E-mail: Christiane.Decker@uni-jena.de, Phone: +49 3641 949906, Fax: +49 3641 949902

Abstract

Purpose: In the present study we introduce an efficient approach for a size- based separation of liposomes from plasma proteins employing AF4. We investigated vesicle stability and release behavior of the strongly lipophilic drug temoporfin from liposomes in human plasma for various incubation times at 37 °C.

Methods: We used the radioactive tracer cholesteryl oleyl ether (COE) or dipalmitoyl-phosphocholine (DPPC) as lipid markers and ¹⁴C-labeled temoporfin. First, both lipid labels were examined for their suitability as liposome markers. Furthermore, the influence of plasma origin on liposome stability and drug transfer was investigated. The effect of membrane fluidity and PEGylation on vesicle stability and drug release characteristics was also analyzed.

Results: Surprisingly, we observed an enzymatic transfer of ³H-COE to lipoproteins due to the cholesterol ester transfer protein (CETP) in human plasma in dependence on membrane rigidity and were able to inhibit this transfer by plasma preincubation with the CETP inhibitor torcetrapib. This effect was not seen when liposomes were incubated in rat plasma. DPPC labels suffered from hydrolysis effects during preparation and/or storage. Fluid liposomes were less stable in human plasma than their PEGylated analogues or a rigid formulation. In contrast, the transfer of the incorporated drug to lipoproteins was higher for the rigid formulations.

Conclusions: The observed effects render COE-labels questionable for in vivo studies using CEPT-rich species. Here, choline labelled ¹⁴C-DPPC was found to be the most promising alternative. Bilayer composition has a high influence on stability and drug release of a liposomal formulation in human plasma.

Abbreviations

AF4: asymmetrical flow field-flow fractionation; CETP: cholesteryl ester transfer protein; COE: cholesteryl oleyl ether; DLS: dynamic light scattering; DPPC: 1,2-Dipalmitoyl-sn-

glycero-3-phosphatidylcholine; DPPG: 1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphatidylglycerol, sodium salt; EPC: L- α -phosphatidylcholine (Egg Chicken); EPG: L- α -phosphatidylglycerol, sodium salt (Egg, Chicken); EPR: enhanced permeation and retention; HDL: high density lipoprotein, LDL: low density lipoprotein; MALLS: multi angle laser-light scattering; mTHPC: temoporfin; PCS: photon correlation spectroscopy; RES: reticuloendothelial system; VLDL: very low density lipoprotein

Introduction

Among all drug molecules entering the market or being promising candidates in the research pipelines of pharmaceutical companies the percentage of highly hydrophobic, water-insoluble drugs is increasing. Hence, solubilisation of hydrophobic substances for mainly intravenous application is a formulation task continuously gaining importance. As the number of potential solvents is limited by toxicity aspects modern and complex solutions like nanosized drug carriers come into focus of present research activities (1).

Liposomes are one prominent example of nanosized carriers and have been investigated in a plethora of publications since their discovery by Alec Bangham in 1961 (2, 3). As their main components phospholipids are the elementary part of human membranes, liposomes are regarded as biocompatible and safe (4). Due to their amphiphilic nature, phospholipids spontaneously form concentric vesicles and liposomes in aqueous environment. Within the lipophilic region of these bilayers hydrophobic substances can be incorporated. By the choice of lipids, the employment of membrane additives or surface modifications it is possible to modify the release profile of the drug formulation (5). Furthermore, liposomes can reach the site of action passively by virtue of the enhanced permeability and retention (EPR) effect or actively by surface modification with antibodies. Thus, the main applications of liposomes are either drug solubilisation or targeting purposes.

If drug solubilisation is the main formulation aim, high liposome stability and stable drug incorporation is not required. Here, fast liposome destruction or uptake by the reticuloendothelial system (RES) and a rapid drug transfer to lipophilic binding domains such

as red blood cell membranes, lipoproteins or albumin may be desired. Small liposomes (increased specific surface area) with a liquid-crystalline membrane state (“fluid liposomes”) are a possible approach to overcome this issue (6). In contrast, a more ambitious aim is the use of liposomal carriers for drug targeting purposes. In this case, highly stable, long circulating, non- or late-disintegrating vesicles are needed and the drug should be firmly incorporated within the lipophilic core of the liposomal bilayer in order to reach the site of action. Addition of cholesterol or PEGylated lipids to the bilayer or the usage of phospholipids with a phase transition above the body temperature (“rigid liposomes”) are beneficial for this intention (7-9). However, because of a missing protective barrier between drug molecules and potential acceptor sites, collision and diffusion mechanisms can lead to an early enhanced release of the drug out of the liposomal bilayer. Lipoproteins are quite abundant in blood and come immediately into contact with liposomes after their intravenous injection. Consequently, recent pharmacokinetic studies have shown that e.g. the lipophilic photosensitizer Temoporfin (mTHPC) is rapidly released from rigid liposomes and transferred to lipophilic acceptor domains (5, 10, 11). Hence, simultaneous investigations on vesicle stability and drug transfer in presence of human plasma *in vitro* are important tools for the understanding of liposomal interactions with physiological fluids.

In order to investigate liposome – plasma protein interactions as a function of time, both species need to be separated again after an incubation period. In the past, separation methods based on size exclusion chromatography (SEC) (7, 11-13) or density gradient ultracentrifugation (8) seemed to be promising approaches to measure these interactions.

Asymmetrical flow field-flow fractionation (AF4) is another analytical tool for the separation of complex samples over a large colloidal size range without the need of a stationary phase. Hence, non-specific interactions and shear forces are reduced to a minimum ensuring a gentle separation. In AF4, particles are separated according to their hydrodynamic size with the smallest particles eluting first. By adjusting various parameters a well-defined separation can be achieved within an appropriate time range (14). AF4 already proved its suitability for the separation and characterization of human plasma within a short time (15, 16). It has also

proven as a successful tool for drug-protein-interactions (17). Likewise, there are several publications focusing in depth on the characterization of liposomal formulations (18-20). Moreover, there has been a recent study about investigations on drug transfer of the lipophilic photosensitizer p-THPP between liposomes of different size ranges via on-line detection (21).

The aim of this study was to show the feasibility of AF4 for a comparably fast and high-resolving separation of an incubated plasma-liposome sample in respect of time, reproducibility and comparability with established methods. Furthermore, we were focusing on principal aspects of the experimental design, which may influence such experiments extraordinarily. Therefore, first experiments were performed employing a well-known liposomal formulation. mTHPC was incorporated either in fluid EPC/EPG or more rigid DPPC/DPPG liposomes, which have already been intensively investigated in the past (5, 7, 10, 11). For analytical purposes, liposomes were labelled by a radioactive lipid label indicating liposomal stability and radioactive labelled drug was used as a tracer for the drug transfer. In total, the suitability of four lipid labels was compared and difficulties with label hydrolysis and enzymatic exchange had to be investigated further. Furthermore, the influence of the plasma origin and lipid composition on liposome stability and drug transfer was examined.

Material and methods

Materials

The phospholipids L- α -phosphatidylcholine (egg, chicken; EPC) as well as L- α -phosphatidylglycerol, sodium salt (egg, chicken; EPG, Na) were kindly provided by Lipoid GmbH (Ludwigshafen, Germany) and 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DPPC), 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoglycerol, sodium salt (DPPG, Na) as well as 1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[methoxy (polyethylene glycol)-2000] (ammonium salt) (mPEG2000-DSPE) by Genzyme (Liestal, Switzerland), respectively. Temoporfin (mTHPC; 5,10,15,20-tetrakis (3-hydroxyphenyl)-porphyrine) and ^{14}C -mTHPC

were supplied by biolitec Research GmbH (Jena, Germany). The radioactive lipid labels ^3H -cholesteryl oleyl ether (^3H -COE), ^3H -DPPC and both ^{14}C -DPPC were all purchased from Biotrend Chemicals (Cologne, Germany). Lipoproteins, low density (LDL, human) and high density (HDL, human) as well as albumin (human), Sudan Black B, Methanol (HiPerSolv CHROMANORM® HPLC gradient grade > 99%) and ethanol (AnalaR Normapur®, $\geq 99\%$, Ph. Eur. for synthesis) were obtained from VWR International GmbH (Darmstadt, Germany). Chloroform (Rotisolv® HPLC), dimethyl sulfoxide (DMSO, ROTIPURAN®, ($\geq 99.8\%$ p.a.), sodium chloride ($\geq 99.8\%$), TRIS (Pufferan®, $\geq 99.9\%$, p. a.), sodium azide ($\geq 99\%$, p. a.), hydrochloric acid (2 N), chloroform (ROTISOLV® HPLC) and Rotiszint® Eco plus, a ready-to-use scintillation cocktail, were all obtained from Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Germany). α -D (+)-glucose anhydrous was purchased from Roquette GmbH (Frankfurt, Germany) and torcetrapib ($\geq 98\%$, HPLC grade), a cholesteryl ester transfer protein (CETP) inhibitor, from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), respectively.

Ultrapure water (RIOs™ 8, Milli-Q® Advantage A10® System, Merck Millipore, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) was employed for preparation purposes and purified water (Millipore Direct Q™, Merck Millipore) for size determination measurements, respectively.

Liposome composition and preparation

Table I summarizes all prepared and investigated formulations. Principally, fluid EPC/EPG liposomes (9:1 (w/w), 20 mg/ml) were compared with DPPC/DPPG liposomes (9:1 (w/w), 20 mg/ml) representing a formulation with increased bilayer rigidity at 37°C. The hydrophobic model drug temoporfin was incorporated into both liposomal membranes at a concentration of 8 mol% relative to phospholipids. Traces of ^{14}C -temoporfin (range between 4 to 40 $\mu\text{Ci/ml}$ liposome suspension) were used as a representative marker for drug transfer. As liposomal membrane labels ^3H -COE, ^3H -DPPC or ^{14}C -DPPC were used. The ^{14}C -atom was either located at a fatty acid or the choline methyl group. All formulations were prepared in 5 % (w/v) glucose solution (sterile syringe filter, 0.2 μm pore size, VWR, Darmstadt, Germany).

All liposomes were prepared by using the thin lipid film hydration method followed by extrusion (22). In brief, lipids and temoporfin were dissolved in chloroform or ethanol, respectively. Radioactive labels were already obtained as stock solution in toluol or ethanol. All stock solutions were mixed together in a specified ratio and film formation was performed by evaporating the organic solvents using a rotary evaporating system (Rota Vapor R-114 and Vacobox B-177, Büchi Labortechnik GmbH, Essen Germany) and drying the film for at least two hours. Rehydration of the dried lipid film was performed by adding glucose solution and gently shaking. After an equilibration time of at least 1 hour the resulting dispersion of multilamellar liposomes was extruded 41 times through polycarbonate membranes with a nominal pore size of 100 nm (Armatis, Mannheim, Germany) employing a hand extruder (LiposoFast Basic, Avestin Inc., Ottawa, Canada). The whole preparation process was carried out well above the phase transition temperature of the lipids and under light protection. The final formulations were stored at 4°C until they were used. PEGylated liposomes were purified by ultracentrifugation (Beckman XL80 equipped with a SW 55 Ti rotor, Beckman Coulter, Brea, CA, USA) at 200,000 g at 4 °C for 3 h.

Photon correlation spectroscopy (PCS)

Size determination was carried out directly after liposome preparation employing dynamic light scattering measurements (Zetasizer NanoZS) in the backscattering mode (173°). Optimal measurement conditions were indicated by an attenuator index between 6 and 8 and achieved by sample dilution with 5% (w/v) glucose solution (sterile syringe filter, 0.2 µm pore size). The temperature was set to 25°C and a sample viscosity of 1.0600 cP (glucose 5% w/w at 25°C) was assumed (23). Measurements were either performed in the manual (four runs, each lasting 5 min) or in the automatic (four runs, each with twelve to 16 measurements) mode.

Plasma preparation

Human blood was collected from five healthy volunteers (three male, two female) having fasted for twelve hours. Rat blood was obtained from male Wistar rats. The donated blood

was centrifuged (Eppendorf 5804R, Eppendorf AG, Hamburg, Germany) at 4500 relative centrifuge force (rcf) for 10 min. Aliquots of the obtained plasma were frozen to -20°C and thawed on the day they were used. Aliquots were filtered through a 0.2 µm RC syringe filter (Rotilabo® Mini-Tip, Carl Roth, Karlsruhe, Germany). If not stated otherwise, plasma of one male donor was used and samples for investigations on transfer kinetics were prepared by mixing 1.5 µmol liposomal lipid with 500 µl plasma and diluted with buffer to a final volume of 1 ml (12). Incubation was performed at 37 °C in a water bath under light protection and for defined time intervals ranging from 0.5 to 48 h. Afterwards, the sample was applied to the separation device as described below. Non-separated sample was kept as a reference.

Asymmetrical Flow Field-Flow Fractionation (AF4)

AF4 measurements were performed at 25°C on an AF2000 MT system (Postnova Analytics, Landsberg, Germany) coupled to a refractive index (RI, PN 3150), multi-angle laser light scattering (MALLS, PN3070), dynamic light scattering (DLS, Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments, Herrenberg, Germany) and a variable wavelength (UV/Vis, PN3211) detector. The UV/Vis detector was set at a wavelength of 280 nm if not stated otherwise. Data were collected at intervals of 0.5 s and evaluated by the AF2000 Control software (version 1.2.0.19). For size analysis of the liposome fraction using the MALLS-detector, a sphere model was used to calculate the radius of gyration (R_g).

The separation channel was equipped with a trapezoidal spacer with an overall area of 31.6 cm² and a height of 500 µm. A membrane of regenerated cellulose with a MWCO of 10 kDa served as accumulation wall. A buffer composition of 150 mM NaCl, 10 mM Tris (pH 7.4) and 0.03% (w/v) NaN₃ was used as carrier liquid and for sample dilutions.

Samples were eluted with a detector flow rate of 1 ml/min. The sample was injected via a loop injector with a volume of 20.31 µl (specified by the vendor) into the channel during the focusing step with an injection flow rate of 0.2 ml/min, a cross-flow rate of 4 ml/min and a resulting focus-flow rate of 4.2 ml/min over 12 min. After a transition time of 1 min the cross-flow was kept constant at 4 ml/min for 18 min and then decreased exponentially within 30

min to 0.4 ml/min and within another 10 min to 0.01 ml/min. The cross-flow was kept constant at 0.01 ml/min for 15 min and at 0.00 ml/min for another 4 min to ensure complete sample elution. Samples were collected for further analyses in 1 ml fractions between 18 and 82 min.

To evaluate whether system parameters (e. g. conditions during the elution or focus step) have an influence on drug transfer and to determine the experimental time point $t = 0$ as realistically as possible liposomes and human plasma were mixed when starting the separation by injecting them separately. Therefore, an equivalent amount of human plasma was injected into the AF4 channel as described above. Subsequently, the injection loop was opened again after 2 minutes and an equivalent amount of liposome formulation was injected. The sample was focused for 10 more minutes and separated as described above.

Lipoprotein staining and peak identification

Identification of the peaks for albumin, HDL and LDL was achieved with the help of protein standards. According to average human lipoprotein levels (24) and albumin reference ranges (25), solutions with a albumin level of 5 g/dl, HDL cholesterol level of 40 mg/dl or a LDL cholesterol concentration of 140 mg/dl were prepared, diluted with buffer and separated as described above. The resulting elution profiles were compared with the profile obtained for human plasma.

Additionally, human plasma and the standard solutions were stained with Sudan Black B according to the following protocol (15): 250µl human plasma or a corresponding amount of protein standards were diluted with buffer to 500 µl. 15 µl of 1% (m/v) Sudan Black B in DMSO were added and the samples were stirred gently for 20 min. Samples were separated with AF4 as described before with the UV/Vis detector set at a wavelength of 600 nm.

Liposome – plasma protein interactions: Suitability of lipid labels

For selected formulations the stability in plasmas obtained from five different people was investigated. Furthermore, the suitability of various lipid labels as a marker for liposome

stability was examined (Table I). To evaluate the effect of hydrolysis of DPPC labels e.g. during liposome preparation, storage or incubation on their transfer behavior, stability of liposomes traced with two different DPPC labels was investigated after preparation and after 9 month storage.

In order to clarify whether the employed lipid label ^3H -COE is transferred by CETP or not, further incubation experiments were performed with some modifications. First, incubation temperature was changed to 4°C. Second, liposomes were incubated with isolated lipoproteins (pure HDL or LDL standard solutions as described above). Both standards were mixed with liposomes and diluted with buffer separately. Samples were incubated at 37°C for two hours in a water bath and subsequently separated by AF4. Third, rat plasma was used instead of human plasma.

CETP inhibition and its effect on lipid and drug transfer

As a fourth modification, human plasma was pre-incubated with the CETP inhibitor torcetrapib (26). For this purpose, 10 µL torcetrapib stock solution (5 mM torcetrapib in DMSO) was added to 500 µl human plasma. This mixture was diluted with buffer as described above yielding a final torcetrapib concentration of 50 µM ensuring complete enzyme inhibition. The inhibitor containing plasma was pre-incubated at 37°C for twelve hours. Afterwards liposomes (formulations 2 and 6) were added and experiments were proceeded as described above. To evaluate any effect of the solvent DMSO, 10 µl of the pure solvent was added to 500 µl human plasma, diluted with buffer and proceeded as described above. Furthermore, the effect on rat plasma and the influence of torcetrapib on lipid and drug transfer in rat plasma was investigated using the same protocol.

Liquid Scintillation Counting (LSC)

Samples were transferred to 5 ml scintillation vials and mixed with a ready-to-use liquid scintillation cocktail (Rotiszint® eco plus, Carl Roth, Karlsruhe, Germany) in a ratio of 1:2 by vortexing the vials for at least 30 sec. As a reference 20 µl of non-separated samples and 5 µl of the pure liposome samples were mixed with 500 µl buffer and 2 ml cocktail.

Radioactivity was determined by LSC using a Tricarb 2800 TR LSC (PerkinElmern, Rodgau, Germany). Radioactivity, expressed as disintegrations per minute (dpm), was measured over 5 min. A blank (500 µl buffer in scintillation cocktail) was subtracted from all other samples.

Data analysis

The obtained elution profiles (radioactivity as percentage of total applied amount for each fraction in dependency of the elution time) were analyzed by Peakfit v4.12 (Systat Software Inc., San Jose, California, USA) according to the residuals method. Area of each peak is a measure of the amount of lipid and drug content in the fractions.

Results

Characterization of liposomal formulations

Table I shows the results of the size analysis. Extrusion of liposomes resulted in a mean particle size of approximately 100 nm. Polydispersity indices below 0.1 indicate a narrow unimodal size distribution for all formulations. Ultracentrifugation of the PEGylated formulation (formulation 3) separated smaller structures into the supernatant, containing $8.8 \pm 1.2\%$ of the added ^{14}C -DPPC label but only traces of ^3H -COE. PEG-PE₂₀₀₀ conjugates are well-known to form few mixed phospholipid/PEG-lipid micelles, which co-exist with liposomes as main structure (27). The different distribution pattern of both lipid labels between the numerically predominant liposomes and the few separated micelles may be caused by their different structure. While ^{14}C -DPPC as a phospholipid based label is distributed like normal DPPC between micelles and liposomes the cholesterol derivative ^3H -COE is solely located in the liposomes due to the curvature reducing effect of cholesterol (28).

Separation of human plasma and liposomes employing AF4.

For method development, evaluation and peak identification, standard solutions of albumin, HDL and LDL were analyzed separately (Figure 1A). In accordance with these results, the separation of pure human plasma revealed the following elution times: albumin (22 min), HDL (31 min), LDL (52 min) and VLDL (63 min) (Figure 1B). Peak identity of the lipoproteins

HDL, LDL and VLDL was confirmed further by specific staining with Sudan Black B (Figure 1B). Additionally, on-line DLS measurements of the highly diluted samples revealed particle sizes with z-averages of 8.6 nm for albumin, 12.4 nm for HDL, 25 nm for LDL and 44 nm for VLDL. In Figure 1C, human plasma and fluid EPC/EPG liposomes containing mTHPC (formulation 2) were analyzed separately. Unfortunately, liposomes showed a peak maximum at 65 min and hence, co-elute with a potential VLDL-peak. Finally, a representative elution profile of an incubated plasma-liposome sample is displayed in Figure 1D. Formulation 2 was incubated with human plasma at 37°C for 12 hours. Plasma was pre-incubated with torcetrapib for 12 hours prior liposome addition. The distribution curves of lipid and drug label correlate well with the elution profile and 4 well separated fractions can be identified with increasing size as: albumin (1), HDL (2), LDL (3) and liposomes/VLDL (4). These fractions showed a more pronounced signal in the MALLS-detector, which is caused by lipophilic binding of the fluorescent drug.

Recoveries were >90% (mean values) for all lipid labels and $83 \pm 13\%$ (n=54) for ^{14}C -temoporfin ensuring a complete sample elution. Traces of mTHPC could be found in the cross-flow ($8 \pm 2\%$) and absorbed residues could be seen visually on the membrane. In principal, recorded elution profiles and evaluation of the obtained data indicate a good reproducibility of the experimental results.

Liposome stability and lipid transfer

Effect of human plasma origin on liposome stability

Rigid and fluid liposome formulations (formulation 1 and 4) were double labeled with two different lipid labels and incubated with human plasma for 2 hours. The plasma was obtained from five healthy donors (3 male, 2 female). Figure 2 shows that only minor gender-specific differences and deviations within each group could be found for both lipid labels. The same was observed for mTHPC transfer out of rigid and fluid liposomes (formulation 2 and 6) (data not shown).

Suitability of lipid labels

The liposome formulations in Figure 2 were simultaneously labeled with ^{14}C -COE, representing a cholesterol based derivative and ^3H -DPPC, a phospholipid based lipid label. Rigid DPPC/DPPG liposomes showed high stability during 2 hours incubation period in human plasma with $86.1 \pm 1.2\%$ ^3H -COE and $88.9 \pm 1.1\%$ ^{14}C -DPPC recovered in the liposome fraction. Even with increasing incubation time, no difference between ^3H -COE and ^{14}C -DPPC with regard to liposome stability could be observed (Figure 3). In contrast, a significant difference between both labels was found in case of the fluid EPC/EPG formulation. While only a minor part ^3H -COE was left in the liposome fraction ($21.7 \pm 8.3\%$), the ^{14}C -DPPC label mostly remained in the liposome fraction ($73.3 \pm 3.7\%$). These results may indicate that there is another prominent transfer mechanism for COE in addition to the transfer caused by liposome instability. The addition of 6% mPEG₂₀₀₀-DSPE to an EPC/EPG bilayer increased its stability in human plasma (Figure 3). It also reduced the observed effects for COE and both employed labels indicate similar stability values. In that case, e.g. 94.93% ^3H -COE and 89.85% ^{14}C -DPPC were recovered in the liposome fraction after 2 hours incubation time (Figure 3). Slight differences were observed in the transfer pattern of both labels. While ^3H -COE mainly binds to HDL and to a lower extent to LDL, ^{14}C -DPPC also binds to albumin. In addition, COE shows a redistribution from HDL to LDL at longer incubation times (data not shown).

Enzymatic transfer of COE

In order to clarify the reason for the remarkable difference between ^3H -COE and ^{14}C -DPPC transfer out of EPC/EPG formulations further analysis was focused on a probable enzymatic transfer. Reduction of the incubation temperature for formulation 2 to 4 °C could only reduce the lipid transfer for incubation times above 2 hours (Figure 4). However, the amount of ^3H -COE found in the liposome fraction remained almost constant for all incubation times (~35%) indicating a fast transfer during the separation process e.g. the focus step while the liposomes were in general stable at 4°C in human plasma. mTHPC transfer out of the liposomes was also reduced by a factor of 3. Due to the reduced temperature the Brownian motion is also reduced and hence the diffusion of the drug as well as the collision of

liposomes with plasma proteins decreases. Furthermore sample viscosity is increased again leading to a reduction of diffusion and collision processes. Additionally, liposomes (formulation 1) were incubated with isolated albumin and lipoprotein standards. Here, the formulation did not show an enhanced lipid transfer as it was seen after incubation with “complete” human plasma. 100% of the COE lipid label remained in the liposome fraction after 2 hours incubation time of liposomes with pure albumin, 95.06% after incubation with HDL and 88.83% when the formulation was incubated with LDL. In comparison, the values for ^{14}C -DPPC were similar and 95.60%, 89.20% and 94.31% were found in the liposome fractions, respectively.

The most remarkable effect on the observed ^3H -COE transfer was caused by the pre-incubation of human plasma with the CETP inhibitor torcetrapib. Especially EPC/EPG liposomes show a distinct increase in the amount of ^3H -COE remaining in the liposome fraction for each time point (e.g. 96% vs 54% for 0.5 hours and 49% vs 18% for 48 hours incubation time). Additionally, the observed redistribution of the lipid label could not be found in case of CETP inhibition

There was also a reduction of ^3H -COE transfer (especially after 12 h) in the case of PEGylated EPC/EPG (formulation 3) when CETP was added. Generally, transfer of both lipid labels was lower for PEGylated as compared to non-PEGylated EPC/EPG liposomes indicating that PEGylation increases liposomal stability in human plasma. In pre-treated plasma, 84% COE but only 70% of the DPPC label remained in the vesicles. In contrast, equivalent amounts of both lipid labels were found in the liposome fraction for longer incubation times for non-treated.

Rigid DPPC/DPPG liposomes (formulation 4) were highly stable in human plasma with 90% of the vesicles still being intact after 12 hours. While the values for ^{14}C -DPPC were equal in pre- and non-pre-incubated plasma, for the amount of ^{14}C -COE the liposome fraction was slightly higher at each time point when torcetrapib was added.

Figure 3B shows that the enzyme inhibitor had no effect for ^{14}C -DPPC transfer and distribution for all formulations. This is also the case for temoporfin (Figure 4B). Finally we could show, that DMSO as solvent for torcetrapib had no influence on all transfer results (Figure 4).

Rats are deficient in CETP activity (29). To validate these findings, rat plasma with or without torcetrapib pre-incubation was mixed with fluid EPC/EPG liposomes (formulation 2) for 48 hours. Figure 4 shows that the enzyme inhibitor had no effect on the ^3H -COE distribution. Interestingly, the absolute amount of lipid label and ^{14}C -mTHPC recovered in the liposome fraction was significantly higher in rat than in human plasma but the resulting drug-to-lipid ratio was nearly equal (0.65 to 0.7) and kept constant after approximately 4 hours incubation time.

Hydrolysis effects of DPPC used as tracer

DPPC with the label located either on a fatty acid or the choline group have been investigated for their suitability as a potential alternative to ^3H -COE. Both lipid labels were incorporated into a DPPC/DPPG formulation (formulation 5) and the obtained results are displayed in Figure 5. The results for the choline labeled ^{14}C -DPPC indicate a liposome stability over 80% after 48 hours not altering during 9 month of storage. In contrast, a constant amount of the fatty acid labeled ^3H -DPPC was initially recovered in the albumin fraction after 0.5 hours incubation time. After 9 month of storage these values were even increased.

Liposome stability and drug transfer in dependency of the choice of lipids

Finally, a fluid EPC/EPG and a rigid DPPC/DPPG formulation each loaded with 8 mol% temoporfin were compared with respect to liposome stability and drug release in human plasma. Plasma was pre-incubated with torcetrapib. The results are shown in Figure 6. Not surprisingly, the rigid formulation was always more stable in human plasma than the fluid one. 88% of the vesicles were still intact after 48 hours while only 49% of ^3H -COE were found in the liposome fraction for the fluid formulation. In contrast, the total amount of

mTHPC that transferred out of the liposome was higher for DPPC/DPPG liposomes. Here, almost 80% of the drug were transferred to lipophilic domains after 48 hours but only 65% of the applied liposomal drug were released from fluid liposomes, respectively. Size measurements using the MALLS-detector calculated a R_g of the non-incubated fluid liposomes of 37.9 nm. After 0.5 hours, incubation time a R_g of 37.4 nm was calculated for the liposome fraction, which subsequently decreased continuously over the time, ending in R_g values of 35.4 nm after 12 and 32.2 nm after 48 hours. This shrinking of the liposomes could not be observed for the rigid formulation where the R_g value remained constant at 37.0 ± 0.5 nm over the entire incubation period. Unfortunately, size measurements in highly diluted samples employing MALLS-detection are limited to particles larger than 30 nm. Hence, no reliable size data could be obtained for smaller particles such as proteins and lipoproteins.

For the DPPC/DPPG formulation the effect of system parameters (e.g. conditions during the focus or elution step) were investigated. The results are shown in Figure 6C and 6D at incubation time = 0 hours). While the effect on the ^3H transfer was negligible, 11.55% of temoporfin were already transferred to lipoproteins.

Discussion

Suitability of AF4 for investigations on plasma-liposome interactions

In the past, the separation of human plasma employing a field-flow technique for further analytical purposes was discussed by several groups. Thereby, focus was laid e.g. on plasma protein characterization (30), determination of lipoprotein-cholesterol and triglycerides (16, 31) or drug absorption (17). In these cases, plasma protein separation was achieved within 10 to 60 minutes depending on channel geometry and flow-conditions. Separation of liposomes was also achieved within this time range (18-22). However, to our knowledge the separation of liposomes from human plasma by AF4 has not been reported in the literature yet. This approach adds the challenge of an additional separation of liposomes from the lipophilic acceptor domains resulting in a prolonged separation time of 90 minutes.

The resulting elution profiles for human plasma are in good accordance to the profiles shown in literature (15-17). Peaks for albumin, HDL and LDL are well separated. In the light of the experimental conditions (high sample dilution, small particles), particle sizes of these fractions measured by on-line DLS measurements are also in agreement with values published before (32, 33). Lipoprotein staining with Sudan Black B identified the HDL and LDL peaks. The peak between was reported in the literature as IgG (30). Liposomes were well separated from the relevant lipophilic acceptor domains. Unfortunately, an overlap in size with VLDL made a separation of both fractions impossible. However, previous studies have shown that VLDL is not considered as a main acceptor for mTHPC (7, 11, 34, 35). In the present study we used plasma obtained from volunteers having fasted for 12 hours ensuring low triglyceride levels and the absence of chylomicrons (36), whose elution would probably also overlap with the liposome fraction. For the same reason, plasma was filtered through a 0.2 μm filter to ensure the absence of larger particles.

In principal, recovery of the sample is strongly dependent on drug lipophilicity (18), which is therefore the limiting factor in this kind of study. Recovery rates of the lipid labels and mTHPC are in good agreement to similar AF4 studies (18, 21). While only traces of the lipid label were found in the cross-flow or were absorbed on the membrane, larger amounts of mTHPC could be detected visually on or rinsed through the cellulose membrane. Washing out of the drug and sample absorption has already been reported for albumin, free drug (17) or drug carrier systems (19, 37) before. The authors recommended a pre-saturation of the membrane or addition of surfactants (e.g. 0.005% (m/V) Polysorbate 80®) to the carrier liquid to overcome this problem, which occurs mainly for high cross-flow rates as it is the case during the focus step. In our studies most dye could be recovered in the area around the injection spot. Absorption on the membrane could also result in a transfer of the sample back from the membrane to plasma components during the elution. However, our investigations have shown that this effect plays only a minor role.

During the focus step of 12 minutes sample components were concentrated in a small area and sample interactions could occur. Our studies with a rigid DPPC/DPPG formulation have

shown that 11.55% of the drug were released out of the liposomes and transferred to lipoproteins when plasma and liposomes were injected successively. This observed transfer is important to consider for short incubation times but can be neglected if the sample was in contact with plasma for a longer period before.

Suitability of COE as a lipid label

A suitable lipid label for these kind of *in vivo* or *in vitro* kinetic studies is incorporated stably in the liposomal bilayer, is not metabolized during the whole experimental period and shows no additional active or passive transfer behavior.

Cholesteryl ethers are metabolically stable (38) and have been used as a lipid tracer for long time in various *in vivo* and *in vitro* studies. Recent studies revealed that this label exchanges very slowly between two lipid membranes (39). However, a very high transfer for the lipid marker out of an EPC/EPG liposome formulation to lipoproteins in human plasma was described previously (7). Investigations in rabbit plasma have shown, that cholesterol esters as well as cholesterol ethers are substrates of the CETP with the esters showing a two times higher transfer rate (40). Rat plasma is deficient in CETP activity. Hence, it is not surprisingly that an enhanced ^3H -COE transfer was not observed during *in vivo* experiments in rats (5, 41).

Our studies have shown that COE located in fluid liposomal bilayers is indeed a substrate of CETP. Hence, no enhanced COE transfer could be observed when liposomes were incubated with isolated lipoprotein standards or in rat plasma. The pre-incubation of rat plasma with torcetrapib showed also no effect on the lipid label transfer behavior. However, preincubation of human plasma with torcetrapib could inhibit the enzyme induced lipid label transfer. Torcetrapib binds with 1:1 stoichiometry to CETP and 100% of the protein was inhibited at concentrations above 1 μM (26). In our experimental setup, this concentration was exceeded by far and ensured a 100% inhibition of the protein. In human plasma, CETP is mainly bound to HDL and promotes e.g. the redistribution of cholesteryl esters between HDL and LDL (42). Thus, it is explainable that ^3H -COE showed a first initial transfer to HDL

before it was redistributed to LDL at longer incubation times. This redistribution could not be observed to that extent when CETP was inhibited.

CETP induced cholesterol ether transfer was strongly depending on the bilayer composition. It was clearly reduced for the DPPC/DPPG formulation and delayed for a PEGylated EPC/EPG formulation. Obviously, for these formulations the protein was hindered by the rigidity of the bilayer and the PEG-chains to “suck” the lipid label out of bilayer.

Torcetrapib inhibits phospholipid transfer as well (26). However, ^{14}C -DPPC transfer was not affected by CETP inhibition. mTHPC is not a substrate of CETP and hence, no effect of CETP inhibition was observed..

Further studies are necessary to investigate the effect of the bilayer composition on lipid label transfer more in detail.

DPPC as a potential alternative to COE

In the past, radioactive phospholipids have been used as lipid markers for investigations on interactions between liposomes and plasma components (6, 43, 44). This seems to be a reasonable approach as they are original components of the liposomal bilayer.

However, phospholipids in human plasma are a substrate of the phospholipid transfer protein (PLTP). This protein is capable to transport phospholipids from a liposome bilayer to lipoproteins such as HDL (44). In order to bind a phospholipid the protein has to disturb the membrane locally. Hence, the transfer rate is strongly dependent on bilayer composition or membrane curvature. Consequently, transfer out of a bilayer in liquid crystalline state is easier to achieve in comparison to bilayers in gel state (6, 45). Protein mediated phospholipid transfer to lipoproteins can falsify results for liposome integrity (46). In general, active exchange processes are unwanted but as PLTP might also play a role in liposome disintegration, an inhibition would also influence liposome stability. As kinetic profiles for DPPC obtained in our studies were similar to those of COE (in presence of torcetrapib) we conclude that these effects played only a minor role. However, further studies are necessary to get a better overview.

Furthermore, hydrolysis effects also play an important role for the fate of phospholipids in human plasma. In principal, hydrolysis of phospholipids is temperature dependent and increased at higher temperatures (47). Long-time storage or frequent freezing and thawing of phospholipids as well as liposome preparation at higher temperatures can also lead to phospholipid hydrolysis. Additionally, hydrolysis processes also occur in human plasma either intrinsically or due to enzymatic activity (44). For instance, DPPC can be hydrolyzed by lipoprotein lipase (LPL) (48). The resulting lysophospholipids and fatty acids have an influence on the stability, bilayer permeability and hence, release behavior of liposomes (49). Thus, hydrolysis processes of a phospholipid based label also have to be taken into account when being employed as a marker for liposomal stability in human plasma. Depending on the location of the radioactive label the behavior after hydrolysis can vary strongly. This was confirmed by the DPPC double labeled rigid formulation (formulation 5). DPPC labels with the radioactivity located at the choline group show a different transfer behavior after hydrolysis processes in comparison to phospholipid labels with the radioactivity located at the fatty acid. Free fatty acids show higher affinities to albumin (50). Hence, radioactive labeled free fatty acids can be initially transferred to albumin at short incubation times (Figure 5). This percentage increases with storage time. In contrast, phospholipids as well as lysophospholipids are transported in human blood bound to lipoproteins and hence, show higher affinities to lipoproteins, mainly HDL in comparison to free proteins (51). Finally, differences in the transfer behavior of both DPPC markers could be seen not only for 0.5 hours of incubation time but also for longer incubation times. Fatty acid labeled DPPC showed a higher transfer rate in comparison to choline labeled DPPC resulting in an apparent lower liposome stability.

Effect of bilayer composition on liposome stability and drug transfer

Among the investigated formulations, non-PEGylated EPC/EPG liposomes showed the lowest stability in human plasma. Bilayers in liquid crystalline state can be disturbed more easily by foreign molecules than bilayers in gel state. Hence, disintegration of vesicles in plasma due to interactions with plasma proteins is enhanced for fluid liposomes (44, 45).

Here, PLTP induced transport of phospholipids to lipoproteins is only one described mechanism. Consequently, the vesicles may shrink in size. We were able to observe this effect for the fluid EPC/EPG formulation by on-line coupled size measurements. One approach to increase liposomal stability is a change towards gel-phase phospholipids. However, it has been shown in several studies that these bilayers are less capable to hold the lipophilic photosensitizer mTHPC, which is rapidly transferred to potential lipophilic acceptor domains such as lipoproteins or vesicles (5, 10). Therefore, PEGylation of the fluid bilayer seems to be a promising attempt to combine both - stability in human plasma and retention of the drug in the liposomes. Due to steric hindrance effects, interactions with plasma proteins can be reduced in order to achieve an increased blood circulation time (9, 52). In our case, addition of mPEG₂₀₀₀-DSPE to an EPC/EPG bilayer led to a significant reduction of liposome disintegration. Similar studies demonstrated the same effect for similar formulations. Here, it was also shown that the addition of phosphatidyl oligoglycerols as a potential alternative to PEGylated phospholipids yields in an increased stability *in vivo* and *in vitro* (5, 11, 35).

Independently the liposome formulation, mTHPC preferably binds to HDL and LDL during incubation due to hydrophobic interactions (53). Binding to albumin is less pronounced and only slightly increasing for longer incubation times. Recent studies with a similar experimental setup but sample separation by SEC showed a similar release profile of mTHPC for a fluid and a rigid formulation (7). Hence, separation of a plasma-liposome sample by AF4 seems to be a potential alternative to established methods.

Conclusions

Our study introduces a novel approach to measure liposome-plasma protein interactions based on size by employing AF4. Thereby, we obtained a good separation profile for liposomes and the three potential main acceptor domains albumin, HDL and LDL within a relative short time of 90 minutes. On-line coupling of various detectors enabled a simultaneous analysis of the sample e.g. for size determinations. Furthermore, the effect of the bilayer composition on liposome stability and drug release was investigated. As reported before, rigid liposomes and PEGylated fluid liposomes showed higher apparent stabilities in human plasma than a non-PEGylated fluid formulation. In contrast, the fluid formulation was more capable to hold mTHPC within the bilayer. Hence, bilayer composition has a high influence on stability and drug release of a liposomal formulation in human plasma and membrane modifications should be considered to achieve an appropriate behavior. Hence, this should be investigated deeper in future experiments

The “right” lipid label

Requirements for a suitable lipid label were stated as stable incorporation in the liposomal bilayer, no metabolization and no additional transfer behavior except for liposomal instability. The combination of COE with torcetrapib offers a promising approach to fulfill these criteria. Nevertheless, studies on possible interactions with the inhibitor are necessary for each liposomal incorporated drug. DPPC labels are potential alternatives to this setup. However, active transport and hydrolysis (also during storage of the label) are two major limiting factors which have to be considered and analyzed prior to each experiment. Among the used DPPC labels, choline labeled DPPC has to be favored, even though it suffers the drawback of high costs.

Acknowledgements

The authors thank biolitec biomedical technology GmbH (Jena, Germany) for kindly providing mTHPC and ¹⁴C-mTHPC, Lipoid GmbH (Ludwigshafen, Germany) for donation of EPC and EPG as well as Phospholipid Research Center (Heidelberg, Germany) for financial support.

Tables

No.	Formulation	³ H [μCi/ml]	¹⁴ C [μCi/ml]	z-Average [nm]	PDI
1	EPC/EPG (9:1 (w/w), 20 mg/ml) mTHPC (8 mol%)	COE 10 μCi/ml	DPPC ¹ 5 μCi/ml	112 ± 1	0.09 ± 0.01
2	EPC/EPG (9:1 (w/w), 20 mg/ml) mTHPC (8 mol%)	COE 40 μCi/ml	mTHPC 40 μCi/ml	96 ± 3	0.09 ± 0.01
3	EPC/EPG (9:1 (w/w), 20 mg/ml) mPEG₂₀₀₀-DSPE (6 mol%) mTHPC (8 mol%)	COE 10 μCi/ml	DPPC ¹ 5 μCi/ml	89 ± 1	0.08 ± 0.01
4	DPPC/DPPG (9:1 (w/w), 20 mg/ml) mTHPC (8 mol%)	COE 10 μCi/ml	DPPC ¹ 5 μCi/ml	112 ± 1	0.09 ± 0.01
5	DPPC/DPPG (9:1 (w/w), 20 mg/ml) mTHPC (8 mol%)	DPPC ¹ 4 μCi/ml	DPPC ² 2 μCi/ml	102 ± 1	0.09 ± 0.03
6	DPPC/DPPG (9:1 (w/w), 20 mg/ml) mTHPC (8 mol%)	COE 40 μCi/ml	mTHPC 40 μCi/ml	85 ± 2	0.07 ± 0.01
¹ = Label is located at a fatty acid ² = Label is located at a choline methyl group					

Table I. Liposome composition for method establishment and temoporfin transfer studies.

Figures

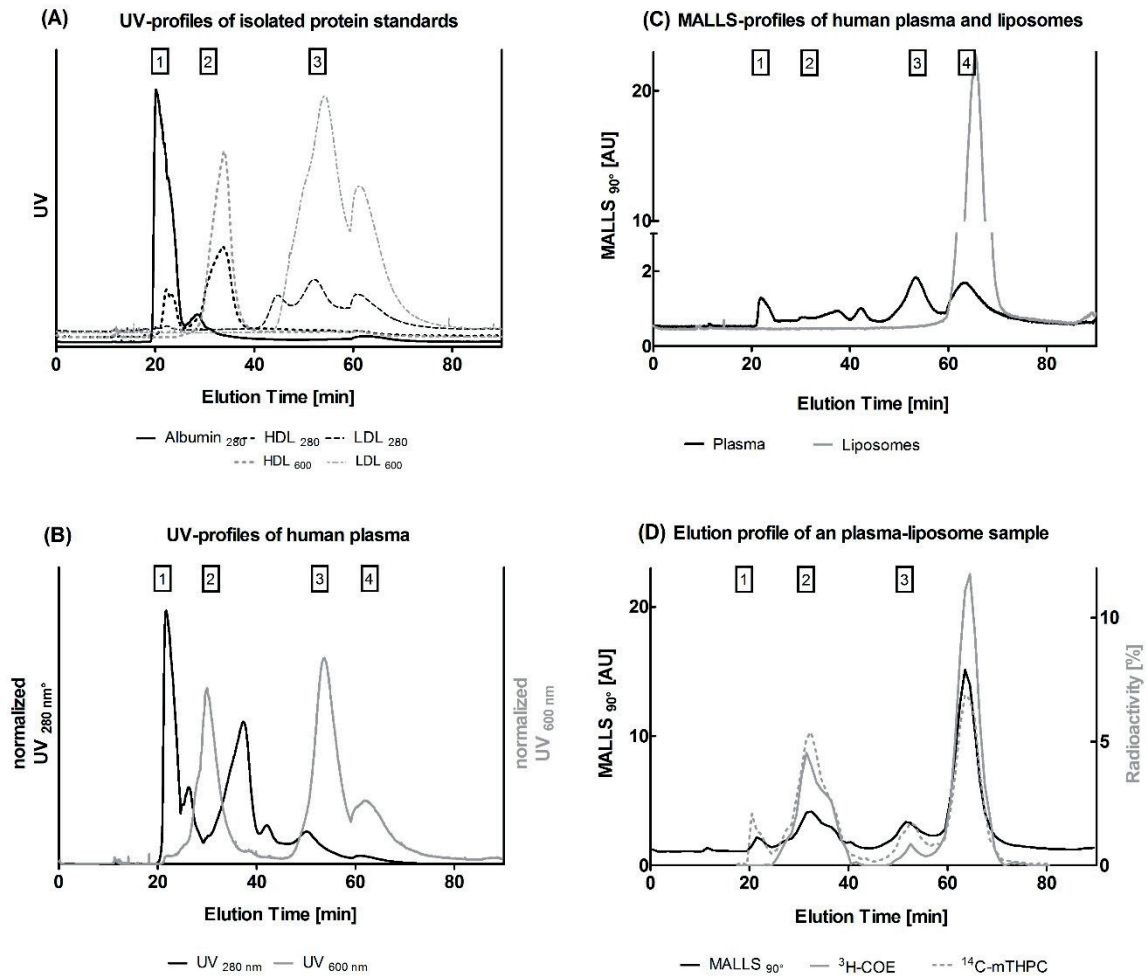


Figure 1A. For peak identification the AF4 elution profiles of the isolated protein standards were recorded (black UV_{280} curves). Based on their size albumin (1), HDL (2) and LDL (3) showed increasing elution times at 20 min, 31 min and 52 min, respectively. With the help of Sudan Black B staining lipoproteins could be specifically detected at 600 nm (grey UV_{600} curves).

Figure 1B. Separation profile of human plasma (black UV_{280} curves). The elution times obtained with the corresponding standards could be reproduced and the four fractions could be separated from each other. In addition, Sudan Black B staining confirmed peak identity of the lipoproteins (grey UV_{600} curve).

Figure 1C. MALLS profiles of human plasma and isolated liposomes, which start eluting at 60 min and hence show an overlay with VLDL.

Figure 1D. Representative separation profile of an incubated plasma-liposome sample. A fluid EPC/EPG formulation (formulation 2 in Table 1) was incubated in human plasma at 37°C for 12 hours. While VLDL and liposomes co-elute after 63 min (4), liposomes could be clearly separated from albumin (1), HDL (2) and LDL (3). The distribution profile of the ^3H -COE lipid label and ^{14}C -mTHPC already indicate that vesicle destruction and drug transfer occur.

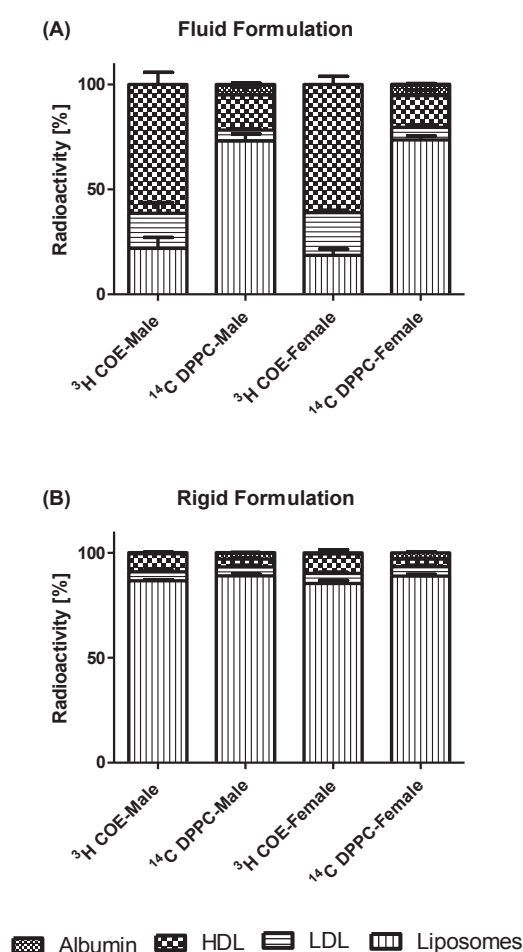


Figure 2. Distribution profile of ^3H -COE and ^{14}C -DPPC from (A) a fluid formulation, consisting of EPC and EPG (formulation 1) and (B) a rigid formulation, consisting of DPPC and DPPG (formulation 4) to plasma proteins after an incubation for 2 hours at 37°C. Both formulations contained 8 mol% mTHPC. Dependencies of lipid transfer on plasma origin were investigated employing plasma obtained from male and female donors (n=8 for male, n=4 for female plasma)

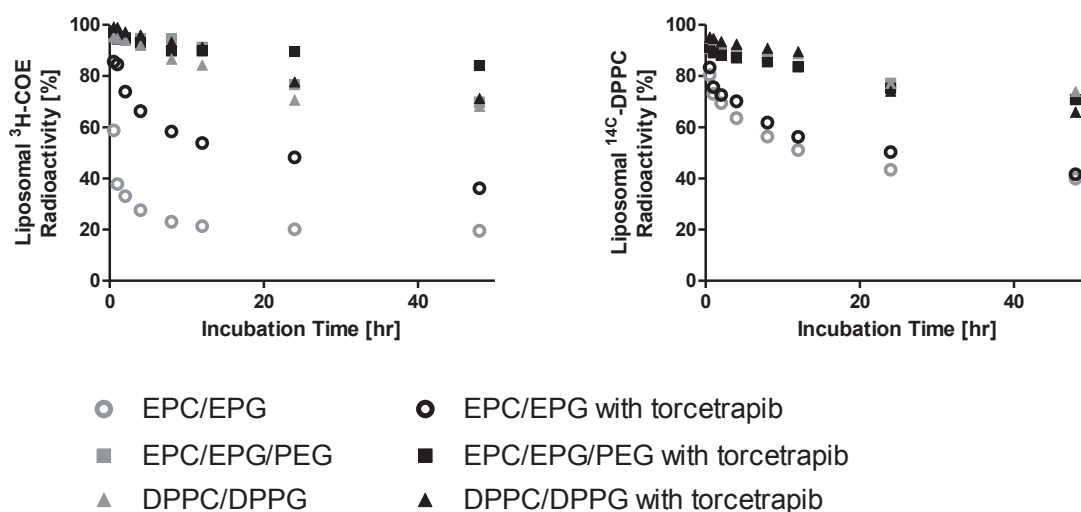


Figure 3. Proportions of (A) ^3H -COE and (B) ^{14}C -DPPC remaining in the liposomal bilayer of fluid (formulation 1), PEGylated fluid (formulation 3) and rigid (formulation 4) mTHPC containing liposomes after incubation in human plasma for various time periods at 37°C. The effect of plasma preincubation with the CETP inhibitor torcetrapib on lipid transfer was investigated.

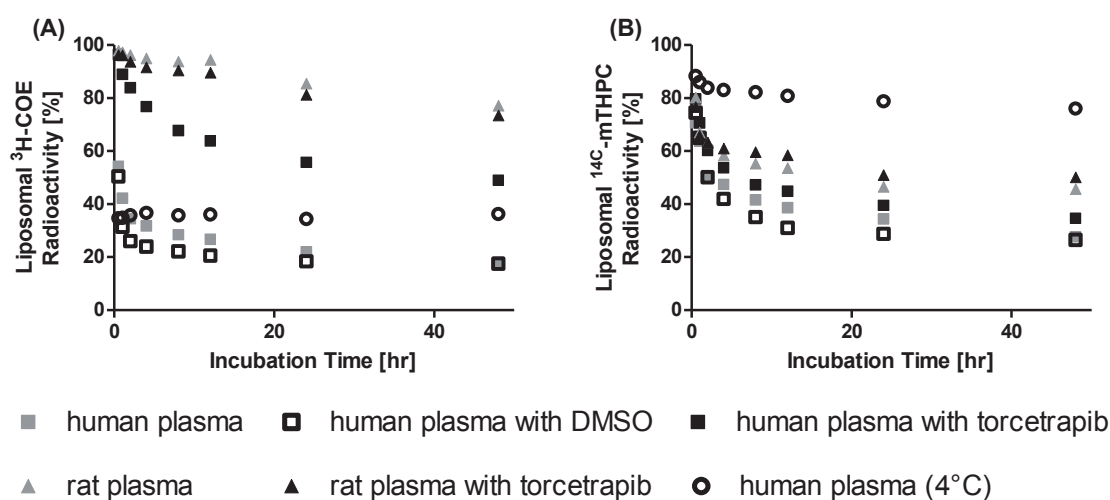


Figure 4. Proportions of (A) lipid and (B) drug remaining in the liposomes after incubation of mTHPC containing EPC/EPG liposomes (formulation 2) in human or rat plasma for various time periods at 37°C and 4°C. The effect of plasma preincubation with the CETP inhibitor

torcetrapib and DMSO, temperature and plasma origin on ^3H -COE and drug transfer was investigated.

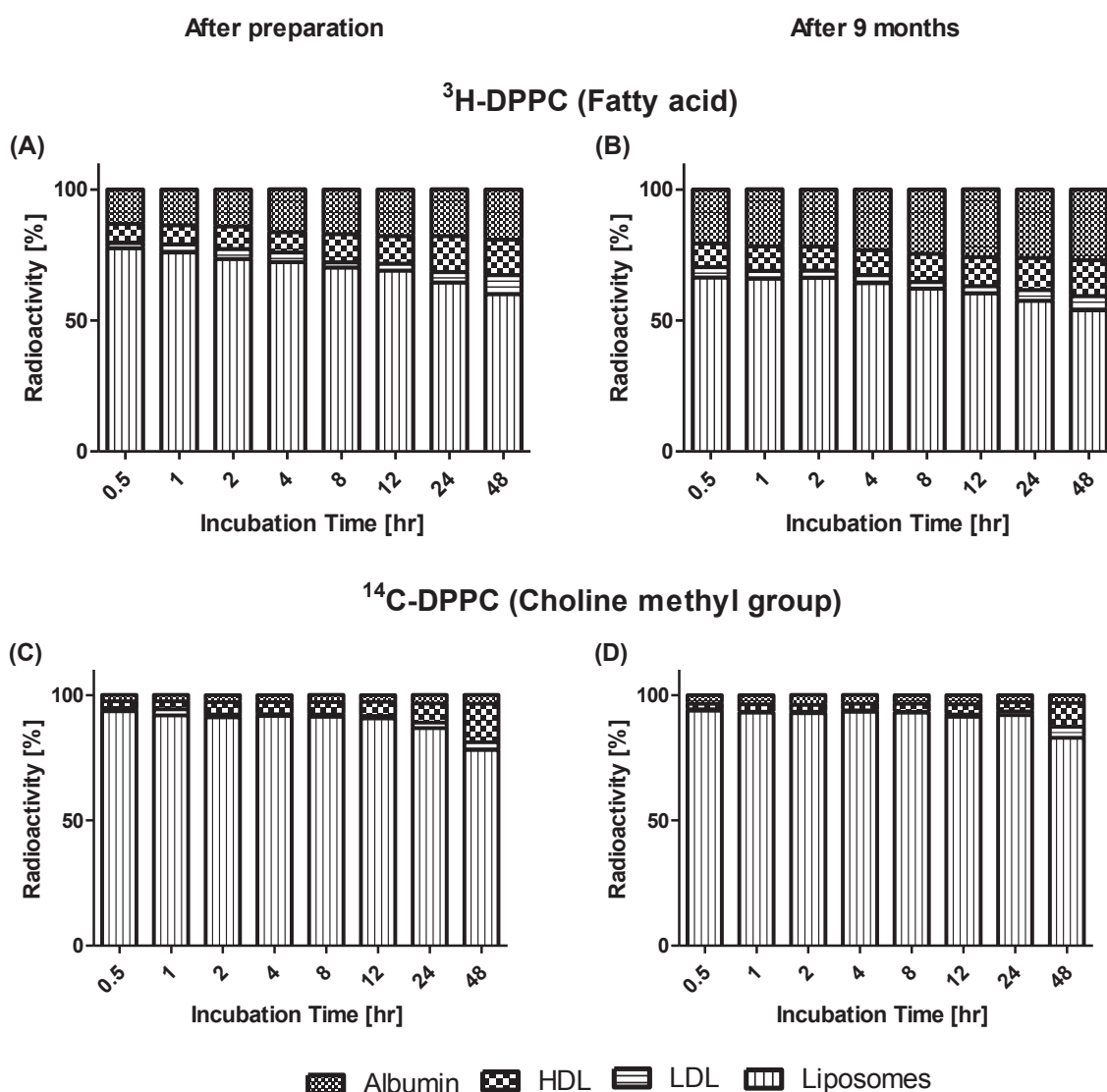


Figure 5. Distribution profiles of a mTHPC containing DPPC/DPPG formulation, double labelled with two different DPPC labels, whereby the ^3H -DPPC was labelled at a fatty acid and the ^{14}C -DPPC was labelled at a choline methyl group (formulation 5). The effect of phospholipid hydrolysis during preparation and storage over nine months was investigated.

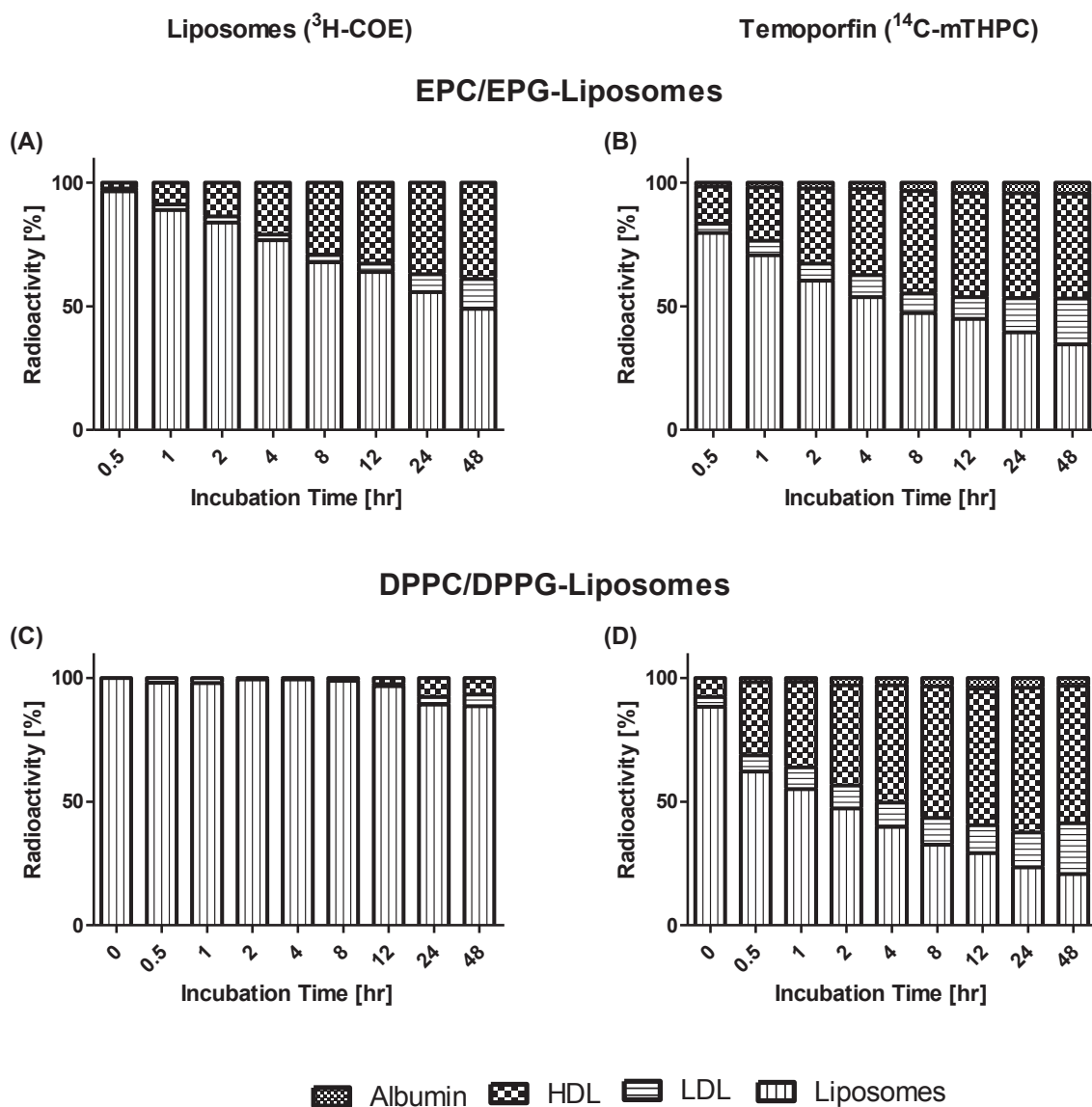


Figure 6. Distribution profiles of ^3H -COE and ^{14}C -mTHPC from a fluid (formulation 2) and a rigid formulation (formulation 6) after incubation at 37°C for various time periods. Plasma samples were preincubated for 12 hours with torcetrapib.

References

1. Fahr A, Liu X. Drug delivery strategies for poorly water-soluble drugs. *Expert Opin Drug Deliv.* 2007;4(4):403-16.
2. Bangham AD, Horne RW. Negative Staining of Phospholipids and Their Structural Modification by Surface-Active Agents as Observed in the Electron Microscope. *J Mol Biol.* 1964;8:660-8.
3. Hoogevest Pv, Leigh M, Fahr A. Liposomes as Intravenous Solubilizers for Poorly Water-Soluble Drugs. *Drug Delivery Strategies for Poorly Water-Soluble Drugs: John Wiley & Sons Ltd; 2013.* p. 37-66.
4. van Hoogevest P, Liu X, Fahr A, Leigh MLS. Role of phospholipids in the oral and parenteral delivery of poorly water soluble drugs. *J Drug Deliv Sci Tec.* 2011;21(1):5-16.
5. Decker C, Schubert H, May S, Fahr A. Pharmacokinetics of temoporfin-loaded liposome formulations: Correlation of liposome and temoporfin blood concentration. *J Control Release.* 2013;166(3):277-85.
6. Scherphof G, Morselt H. On the Size-Dependent Disintegration of Small Unilamellar Phosphatidylcholine Vesicles in Rat Plasma - Evidence of Complete Loss of Vesicle Structure. *Biochem J.* 1984;221(2):423-9.
7. Kaess K, Fahr A. Liposomes as solubilizers for lipophilic parenteral drugs: Transfer of drug and lipid marker to plasma proteins. *Eur J Lipid Sci Tech.* 2014;116(9):1137-44.
8. Guo LSS, Hamilton RL, Goerke J, Weinstein JN, Havel RJ. Interaction of Unilamellar Liposomes with Serum-Lipoproteins and Apolipoproteins. *Journal of Lipid Research.* 1980;21(8):993-1003.
9. Immordino ML, Dosio F, Cattel L. Stealth liposomes: review of the basic science, rationale, and clinical applications, existing and potential. *Int J Nanomed.* 2006;1(3):297-315.
10. Hefesha H, Loew S, Liu XL, May S, Fahr A. Transfer mechanism of temoporfin between liposomal membranes. *J Control Release.* 2011;150(3):279-86.
11. Decker C, Steiniger F, Fahr A. Transfer of a lipophilic drug (temoporfin) between small unilamellar liposomes and human plasma proteins: influence of membrane composition on vesicle integrity and release characteristics. *J Liposome Res.* 2013;23(2):154-65.
12. Choice E, Ayyobi AF, Pritchard PH, Madden TD. Separation of liposomes from plasma components using fast protein liquid chromatography. *Anal Biochem.* 1999;270(1):1-8.
13. Chonn A, Semple SC, Cullis PR. Separation of Large Unilamellar Liposomes from Blood Components by a Spin Column Procedure - Towards Identifying Plasma-Proteins Which Mediate Liposome Clearance In vivo. *Biochim Biophys Acta.* 1991;1070(1):215-22.
14. Wagner M, Holzschuh S, Traeger A, Fahr A, Schubert US. Asymmetric Flow Field-Flow Fractionation in the Field of Nanomedicine. *Anal Chem.* 2014;86(11):5201-10.
15. Lee JY, Choi D, Johan C, Moon MH. Improvement of lipoprotein separation with a guard channel prior to asymmetrical flow field-flow fractionation using fluorescence detection. *J Chromatogr A.* 2011;1218(27):4144-8.
16. Qureshi RN, Kok WT, Schoenmakers PJ. Fractionation of human serum lipoproteins and simultaneous enzymatic determination of cholesterol and triglycerides. *Anal Chim Acta.* 2009;654(1):85-91.
17. Madorin M, van Hoogevest P, Hilfiker R, Langwost B, Kresbach GM, Ehrat M, et al. Analysis of drug plasma protein interactions by means of asymmetrical flow field flow fractionation. *Pharmaceut Res.* 1997;14(12):1706-12.

18. Kuntsche J, Decker C, Fahr A. Analysis of liposomes using asymmetrical flow field-flow fractionation: Separation conditions and drug/lipid recovery. *J Sep Sci.* 2012;35(15):1993-2001.
19. Hupfeld S, Ausbacher D, Brandl M. Asymmetric flow field-flow fractionation of liposomes: 2. Concentration detection and adsorptive loss phenomena. *J Sep Sci.* 2009;32(20):3555-61.
20. Hupfeld S, Ausbacher D, Brandl M. Asymmetric flow field-flow fractionation of liposomes: optimization of fractionation variables. *J Sep Sci.* 2009;32(9):1465-70.
21. Hinna A, Steiniger F, Hupfeld S, Brandl M, Kuntsche J. Asymmetrical flow field-flow fractionation with on-line detection for drug transfer studies: a feasibility study. *Analytical and Bioanalytical Chemistry.* 2014;406(30):7827-39.
22. Decker C, Fahr A, Kuntsche J, May S. Selective partitioning of cholesterol and a model drug into liposomes of varying size. *Chem Phys Lipids.* 2012;165(5):520-9.
23. Kurosawa S, Tawara E, Kamo N, Kobatake Y. Oscillating Frequency of Piezoelectric Quartz Crystal in Solutions. *Anal Chim Acta.* 1990;230(1):41-9.
24. Gordon T, Castelli WP, Hjortland MC, Kannel WB, Dawber TR. High density lipoprotein as a protective factor against coronary heart disease. The Framingham Study. *Am J Med.* 1977;62(5):707-14.
25. Dugdale DC. Albumin - blood (serum): National Library of Medicine; 2013 [updated 2/13/2013; cited 2015 07/23]. Available from: <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/ency/article/003480.htm>.
26. Clark RW, Ruggeri RB, Cunningham D, Bamberger MJ. Description of the torcetrapib series of cholesteryl ester transfer protein inhibitors, including mechanism of action. *J Lipid Res.* 2006;47(3):537-52.
27. Torchilin VP. Micellar nanocarriers: pharmaceutical perspectives. *Pharm Res.* 2007;24(1):1-16.
28. Sandstrom MC, Johansson E, Edwards K. Structure of mixed micelles formed in PEG-lipid/lipid dispersions. *Langmuir.* 2007;23(8):4192-8.
29. Ha YC, Barter PJ. Differences in Plasma Cholesteryl Ester Transfer Activity in 16 Vertebrate Species. *Comp Biochem Phys B.* 1982;71(2):265-9.
30. Rambaldi DC, Zattoni A, Casolari S, Reschiglian P, Roessner D, Johann C. An analytical method for size and shape characterization of blood lipoproteins. *Clin Chem.* 2007;53(11):2026-9.
31. Rambaldi DC, Reschiglian P, Zattoni A, Johann C. Enzymatic determination of cholesterol and triglycerides in serum lipoprotein profiles by asymmetrical flow field-flow fractionation with on-line, dual detection. *Anal Chim Acta.* 2009;654(1):64-70.
32. Mallol R, Rodriguez MA, Heras M, Vinaixa M, Plana N, Masana L, et al. Particle size measurement of lipoprotein fractions using diffusion-ordered NMR spectroscopy. *Analytical and Bioanalytical Chemistry.* 2012;402(7):2407-15.
33. Chicea D, Chicea R, Chicea LM. Hsa Particle Size Characterization by Afm. *Rom Rep Phys.* 2013;65(1):178-85.
34. MichaelTitus AT, Whelpton R, Yaqub Z. Binding of temoporfin to the lipoprotein fractions of human serum. *Brit J Clin Pharmacol.* 1995;40(6):594-7.
35. Reshetov V, Zorin V, Siupa A, D'Hallewin MA, Guillemin F, Bezdetnaya L. Interaction of Liposomal Formulations of Meta-tetra(hydroxyphenyl)chlorin (Temoporfin) with Serum Proteins: Protein Binding and Liposome Destruction. *Photochem Photobiol.* 2012;88(5):1256-64.

36. Cox RA, Garcia-Palmieri MR. Cholesterol, Triglycerides, and Associated Lipoproteins. In: Walker HK, Hall WD, Hurst JW, editors. *Clinical Methods: The History, Physical, and Laboratory Examinations*. 3rd ed. Boston 1990.
37. Lederer A, Boye S. Asymmetrical Flow Field Flow Fractionation for Investigating Intermolecular Interactions of Multifunctional Polymers. *Lc Gc Eur*. 2011;24(12):620-+.
38. Derksen JTP, Morselt HWM, Scherphof GL. Processing of Different Liposome Markers after Invitro Uptake of Immunoglobulin-Coated Liposomes by Rat-Liver Macrophages. *Biochim Biophys Acta*. 1987;931(1):33-40.
39. Fahr A, Seelig J. Liposomal formulations of Cyclosporin A: a biophysical approach to pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*. 2001;18(2):141-72.
40. Green SR, Beltz WF, Goldberg DI, Pittman RC. Cholesteryl oleyl and linoleyl ethers do not trace their ester counterparts in animals with plasma cholesteryl ester transfer activity. *J Lipid Res*. 1989;30(9):1405-10.
41. Fahr A, Holz M, Fricker G. Liposomal formulations of cyclosporin A: influence of lipid type and dose on pharmacokinetics. *Pharm Res*. 1995;12(8):1189-98.
42. Barter PJ, Brewer HB, Jr., Chapman MJ, Hennekens CH, Rader DJ, Tall AR. Cholesteryl ester transfer protein: a novel target for raising HDL and inhibiting atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003;23(2):160-7.
43. Scherphof G, Vanleeuwen B, Wilschut J, Damen J. Exchange of Phosphatidylcholine between Small Unilamellar Liposomes and Human-Plasma High-Density Lipoprotein Involves Exclusively the Phospholipid in the Outer Monolayer of the Liposomal Membrane. *Biochim Biophys Acta*. 1983;732(3):595-9.
44. Scherphof G, Roerdink F, Waite M, Parks J. Disintegration of phosphatidylcholine liposomes in plasma as a result of interaction with high-density lipoproteins. *Biochim Biophys Acta*. 1978;542(2):296-307.
45. Wirtz KW. Phospholipid transfer proteins. *Annu Rev Biochem*. 1991;60:73-99.
46. Damen J, Regts J, Scherphof G. Transfer and exchange of phospholipid between small unilamellar liposomes and rat plasma high density lipoproteins. Dependence on cholesterol content and phospholipid composition. *Biochim Biophys Acta*. 1981;665(3):538-45.
47. Zuidam NJ, Crommelin DJ. Chemical hydrolysis of phospholipids. *J Pharm Sci*. 1995;84(9):1113-9.
48. Shirai K, Fitzharris TJ, Shinomiya M, Muntz HG, Harmony JA, Jackson RL, et al. Lipoprotein lipase-catalyzed hydrolysis of phosphatidylcholine of guinea pig very low density lipoproteins and discoidal complexes of phospholipid and apolipoprotein: effect of apolipoprotein C-II on the catalytic mechanism. *J Lipid Res*. 1983;24(6):721-30.
49. Zuidam NJ, Gouw HKME, Barenholz Y, Crommelin DJA. Physical (in)Stability of Liposomes Upon Chemical Hydrolysis - the Role of Lysophospholipids and Fatty-Acids. *Bba-Biomembranes*. 1995;1240(1):101-10.
50. Hamilton JA, Cistola DP. Transfer of oleic acid between albumin and phospholipid vesicles. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986;83(1):82-6.
51. Murata N, Sato K, Kon J, Tomura H, Yanagita M, Kuwabara A, et al. Interaction of sphingosine 1-phosphate with plasma components, including lipoproteins, regulates the lipid receptor-mediated actions. *Biochem J*. 2000;352 Pt 3:809-15.
52. Blume G, Cevc G. Molecular Mechanism of the Lipid Vesicle Longevity In vivo. *Biochim Biophys Acta*. 1993;1146(2):157-68.

53. Senge MO, Brandt JC. Temoporfin (Foscan (R), 5,10,15,20-Tetra(m-hydroxyphenyl)chlorin)-A Second-generation Photosensitizer. *Photochemistry and Photobiology*. 2011;87(6):1240-96.

2.4 Veröffentlichung 3

Investigations of the influence of liposome composition on vesicle stability and drug transfer in human plasma: A transfer study

Stephan Holzschuh, Kathrin Kaeß, Guilherme Volpe Bossa, Christiane Decker, Alfred Fahr,
Sylvio May

Publiziert in: Journal of Liposome Research
Akzeptiert: 07. Oktober 2016
Online: 23. November 2016
DOI: 10.1080/08982104.2016.1247101

This is an author's original manuscript (AOM) of an article published by Taylor & Francis in its unrefereed form; a preprint.

The Version of Record of the revised and accepted manuscript has been published online first in Journal of Liposome Research November 23, 2016. It is available at Taylor & Francis via <http://www.tandfonline.com/10.1080/08982104.2016.1247101>.

Investigations of the influence of liposome composition on vesicle stability and drug transfer in human plasma: A transfer study

Stephan Holzschuh^{1*}, Kathrin Kaeß¹, Guilherme Volpe Bossa², Christiane Decker¹, Alfred Fahr¹, Sylvio May²

¹ Department of Pharmaceutical Technology, Friedrich Schiller University Jena, Lessingstraße 8, D-07743 Jena, Germany

² Department of Physics, North Dakota State University, Fargo ND 58108, USA

* Corresponding author: Stephan Holzschuh, Department of Pharmaceutical Technology, Friedrich Schiller University Jena, Lessingstraße 8, D-07743 Jena, Germany, E-mail: stholzschuh@gmail.com, ORCID: 0000-0001-8659-4070

Abbreviations

AF4: asymmetrical flow field-flow fractionation, CETP: cholesteryl ester transfer protein, COE: cholesteryl oleyl ether, DDS: drug delivery system, DLS: dynamic light scattering, DMPC: 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, DMPG: 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phospho-(1'-rac-glycerol) (sodium salt), DOPC: 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, DOPG: 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoglycerol (sodium salt), DPPC: 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, DPPG: 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoglycerol, sodium salt, DSPC: 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, DSPG: 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phospho-(1'-rac-glycerol) (sodium salt), EPC: L- α -phosphatidylcholine (egg, chicken), EPG: L- α -phosphatidylglycerol (sodium salt) (egg, chicken), HDL: high density lipoprotein, LDL: low density lipoprotein, MALLS: multi angle laser-light scattering, mPEG750-DSPE: 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[methoxy(polyethylene glycol)-750] (ammonium salt), mPEG2000-DSPE: 1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[methoxy (polyethylene glycol)-2000] (ammonium salt) MPS: mononuclear phagozyte system, mTHPC: temoporfin, PLTP: phospholipid transfer protein, POPC: 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, POPG: 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phospho-(1'-rac-glycerol) (sodium salt), PWSC: poorly water-soluble compound, VLDL: very low density lipoprotein

Abstract

Liposomal delivery constitutes a promising approach for i.v. administration of mTHPC because lipid membranes can host these drug molecules. This study investigates the transfer and release of temoporfin to plasma proteins and stability of various liposomal formulations. To this end, we employed traces of radioactive markers and studied the effects of fatty acid chain length and the degree of saturation in the lipophilic tail, addition of cholesterol, and PEGylation of the membrane surface and different drug-to-lipid ratios. Liposomes were incubated in human plasma for various incubation times. Drawn samples were separated by asymmetrical flow field-flow fractionation. Drug was recovered in four fractions identified as albumin, HDL, LDL, and liposomes. Our results suggest that temoporfin fits best into fluid, unmodified bilayers when the drug-to-lipid ratio is low. Membrane rigidification as well as the presence of cholesterol and PEGylated lipids reduced the ability of the membrane to accommodate the drug but simultaneously improved vesicle stability in plasma. Both mechanisms jointly affected the total degree of mTHPC release. We analyzed our data using a kinetic model that suggests the drug to be associated with the host membrane in two distinct states of which only one interacts directly with the plasma compartment.

Keywords

Temoporfin, Pharmacokinetics, Plasma proteins, AF4, Modeling

Introduction

In recent years modern drug discovery techniques have led to the development of highly potent but lipophilic drugs which are difficult to administer. In the field of injectable nanoscaled approaches liposomes have emerged as one of the most promising candidates for drug solubilization. Various marketed products are already in clinical use (Allen and Cullis, 2013). Lipophilic compounds are incorporated in liposomal lipid membranes which are in constant contact with endogenous binding sites such as blood components. Hence, in addition to vesicle destruction further drug release mechanisms, e.g. due to collision of vesicles with plasma proteins, have to be considered in formulation development in order to achieve the desired pharmacokinetic behavior (Decker *et al.*, 2013b).

If liposomes should serve as a plain solubilizer for poorly water-soluble compounds (PWSCs), rapid vesicle disintegration after injection into the blood stream or low bilayer affinity of the drug are desired. Otherwise, long plasma circulation times and low uptake via the mononuclear phagocyte system (MPS) might form the basis for a passive targeting approach via the enhanced permeability and retention (EPR) effect.

In the present work, we systematically investigated the *in vitro* pharmacokinetic behavior of liposomes, which contain the lipophilic model drug temoporfin (mTHPC), in human plasma. mTHPC is a second generation photosensitizer with a log P of 9.24 (Chen *et al.*, 2011).

Because the influence of membrane composition and surface modification on vesicle stability has been intensively investigated in the last decades, it is well known today that the employment of cholesterol and phospholipids with higher melting temperature as well as PEGylation of the liposome surface can reduce the interaction with the MPS and hence prolong plasma circulation time (Klibanov *et al.*, 1990, Papahadjopoulos *et al.*, 1991, Blume and Cevc, 1993, Decker *et al.*, 2013a, van Hoogevest *et al.*, 2013).

Previous *in vitro* studies of liposomal temoporfin focused on the interaction with model membranes (Petersen *et al.*, 2010, Hefesha *et al.*, 2011), erythrocytes (Decker *et al.*, 2013b) or plasma proteins (Reshetov *et al.*, 2011, Reshetov *et al.*, 2012, Decker *et al.*, 2013b, Kaess

and Fahr, 2014) and employed separation techniques such as ion exchange or size exclusion chromatography (SEC) or utilized photoinduced fluorescence quenching and flow cytometry. Moreover, Foslip® (DPPC and DPPG) and Fospeg® (DPPC, DPPG and mPEG2000-DSPE) are two prominent mTHPC-containing formulations. Their *in vivo* behavior have been investigated several times (Decker *et al.*, 2013a, Reshetov *et al.*, 2013, Xie *et al.*, 2015). However, all of these approaches were either focusing on a rather small selection of formulations or suffered from analytical limitations. We recently introduced a novel approach for the investigation of liposome-plasma protein interactions *in vitro* using asymmetrical flow field-flow fractionation (AF4) (Holzschuh *et al.*, 2016). This method provides a separation and on-line detection of the most relevant fractions albumin, HDL, LDL and liposomes within 90 minutes providing some additional separation benefits such as the lack of a stationary phase (Wagner *et al.*, 2014). In addition, radioactive labeling of mTHPC and a lipid component allows a fast and robust analytical detection and quantification. It was shown that the lipid marker cholesteryl oleyl ether (COE) acts as substrate of the cholesteryl ester transfer protein (CETP) in human plasma and that this transfer can be inhibited by torcetrapib for both EPC/EPG and DPPC/DPPG liposomes allowing a simultaneous measurement of vesicle stability and drug release.

In the present work we adopted this method to study the effect of membrane composition on vesicle stability and drug release of mTHPC. Furthermore, we investigated the capability of the bilayer to retain the drug in the membrane. We examined the role of chain length and saturation of the phospholipid tails as well as of cholesterol, surface PEGylation and the effect of drug loading. We subsequently applied a kinetic model to evaluate possible mechanisms of the drug release in more detail. Furthermore, we analyzed the extent of the CETP induced COE-transfer for all investigated formulations.

Material and Methods

Materials

The phospholipids L- α -phosphatidylcholine (egg, chicken; EPC), L- α -phosphatidylglycerol (sodium salt) (egg, chicken; EPG, Na), 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DOPC), 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoglycerol (sodium salt) (DOPG, Na), 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (POPC) as well as 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phospho-(1'-rac-glycerol) (sodium salt) (POPG, Na) were kindly provided by Lipoid GmbH (Ludwigshafen, Germany) and 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DMPC), 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phospho-(1'-rac-glycerol) (sodium salt) (DMPG, Na), 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DPPC), 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DSPC), 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phospho-(1'-rac-glycerol) (sodium salt) (DSPG, Na), 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoglycerol, sodium salt (DPPG, Na), 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[methoxy(polyethylene glycol)-750] (ammonium salt) (mPEG₇₅₀-DSPE) as well as 1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[methoxy(polyethylene glycol)-2000] (ammonium salt) (mPEG₂₀₀₀-DSPE) by Genzyme (Liestal, Switzerland), respectively. Temoporfin (mTHPC; 5,10,15,20-tetrakis (3-hydroxyphenyl)-porphyrine) and ¹⁴C-mTHPC were supplied by biolitec Research GmbH (Jena, Germany). The radioactive lipid label ³H-cholesteryl oleyl ether (³H-COE) was obtained from Biotrend Chemicals (Cologne, Germany). Chloroform (Rotisolv® HPLC), dimethyl sulfoxide (DMSO, ROTIPURAN®, (≥99.8% p.a.), hydrochloric acid (2 N), Rotiszint® Eco plus, a ready-to-use scintillation cocktail, sodium azide (≥99%, p. a.), sodium chloride (≥99.8%) and TRIS (Pufferan®, ≥99.9%, p. a.) and were obtained from Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Germany). α -D(+)-glucose anhydrous was purchased from Roquette GmbH (Frankfurt, Germany) and torcetrapib (≥98%, HPLC grade), a cholesteryl ester transfer protein (CETP) inhibitor, from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), respectively. Ethanol (AnalaR Normapur®, ≥ 99%, Ph. Eur. for synthesis) was supplied from VWR International GmbH (Darmstadt, Germany). Ultrapure water (RiOs™ 8, Milli-Q^R Advantage A10^R System, Merck Millipore,

Merck KGaA, Darmstadt, Germany) was employed for preparation purposes. Size determination measurements were performed employing purified water (Millipore Direct Q™, Merck Millipore).

Liposome composition and preparation

Table I summarizes all investigated formulations. Generally, liposomes were composed of 9:1 (w/w) mixtures of a phosphatidylcholine and the corresponding phosphatidylglycerol both having the same fatty acid composition. The total phospholipid concentration was 20 mg/mL in all cases. Additionally, lipid bilayer composition were modified by the incorporation of cholesterol or PEGylated lipids. The hydrophobic model drug temoporfin was incorporated into liposomal membranes at concentrations between 0.2 and 12 mol% relative to the phospholipids. Traces of ¹⁴C-temoporfin (4 µCi/mL liposome suspension) and ³H-COE were used as a representative marker for drug transfer and vesicle stability, respectively. All formulations were prepared in 5 % (w/v) glucose solution (sterile syringe filter, 0.2 µm pore size, VWR, Darmstadt, Germany).

All liposomes were prepared by using the thin lipid film hydration method followed by extrusion as described before (Holzschuh *et al.*, 2016). In brief, stock solutions of the lipids, temoporfin and the radioactive labels were mixed together in a specified ratio and film formation was performed by evaporating the organic solvents using a rotary evaporating system (Rota Vapor R-114 and Vacobox B-177, Büchi Labortechnik GmbH, Essen Germany). The film was dried for another two hours and subsequently rehydrated by adding glucose solution and gently shaking. After an equilibration time of at least 1 hour the liposome suspension was extruded at least 41 times through polycarbonate membranes with a nominal pore size of 100 nm (Armatis, Mannheim, Germany) with the help of a hand extruder (LiposoFast Basic, Avestin Inc., Ottawa, Canada). The whole preparation process was carried out under light protection. The final formulations were stored at 4°C until they were used.

Photon correlation spectroscopy

The quality of the preparation process was monitored by liposomal size determination employing dynamic light scattering measurements (Zetasizer NanoZS, Malvern Instruments,

Worcestershire, UK). Generally, the backscattering mode (173°) was selected and measurements were either performed in the manual (four runs, each lasting 5 min) or in the automatic (four runs, each with twelve to 16 measurements) mode. Samples had to be diluted with 5% (w/v) glucose solution (sterile syringe filter, 0.2 µm pore size) in order to achieve an attenuator index between 6 and 8. The temperature was set to 25°C and a sample viscosity of 1.0600 cP (glucose 5% (w/w) at 25°C) was adjusted.

Fluorescence spectroscopy

Drug content of the liposomal formulations was determined by fluorescence spectroscopy (LS-50 B luminescence spectrometer, PerkinElmer LAS GmbH, Rodgau, Germany). For this purpose, liposomes were dissolved in ethanol and diluted to a final theoretical drug concentration in the range of 51 to 75 ng/mL. Measurements were performed in a 101-QS quartz cuvette (Hellma GmbH & Co. KG, Müllheim, Germany) at an excitation wavelength of 418 nm and an emission wavelength of 651 nm. The cut-off of the emission filter was set at 530 nm and excitation and emission slits were adjusted to 10 nm. The integration time was set at 1 s. Drug content was then calculated with the help of a regression curve (regression coefficient: 0.99998). Background measurements employing blank ethanol were subtracted from all other measurements. All measurements were performed in triplicate.

Sample preparation

Human blood was collected from a single healthy male donor having fasted for twelve hours. In order to obtain plasma blood was centrifuged (Eppendorf 5804R, Eppendorf AG, Hamburg, Germany) at 4500 relative centrifuge force (rcf) for 10 min. Aliquots were frozen to -20°C, thawed on the day they were used and filtered through a 0.2 µm RC syringe filter (Rotilabo® Mini-Tip, Carl Roth, Karlsruhe, Germany).

Protein binding of non-liposomal mTHPC

An ethanolic mTHPC stock solution was prepared (7.5 mg/mL mTHPC) and spiked with ¹⁴C-temoporfin (20 µCi/mL). In order to measure concentration dependent plasma protein binding of the drug, the temoporfin concentration within the samples was increased from 0.06 to 3.60*10⁻⁷ mol/mL plasma. Respective amounts of the stock solution were added to 500 µL

plasma and diluted with buffer (150 mM NaCl, 10 mM Tris (pH 7.4) and 0.03% (w/v) NaN₃) to 1 mL. Samples were incubated for 1 hour at 37°C and were subsequently fractionated with AF4.

Transfer studies of liposomal mTHPC

To ensure inhibition of an additional transfer of ³H-COE, 10 µL of a torcetrapib stock solution (5 mM in DMSO) was added to 500 µL human plasma. This mixture was diluted with buffer and pre-incubated at 37°C for 12 hours. Subsequently, 1.5 µmol liposomal lipid was added and incubated at 37 °C in a water bath under light protection for defined time intervals ranging from 0.5 to 120 hours. Afterwards, the sample was applied to the separation device.

Asymmetrical flow field-flow fractionation

Separation of the incubated samples was performed employing AF4 technique as described before (Holzschuh *et al.*, 2016). In brief, we used an AF2000 MT system (Postnova Analytics, Landsberg, Germany) coupled to a refractive index (RI, PN 3150), multi-angle laser light scattering (MALLS, PN3070) and a variable wavelength (UV/Vis, PN3211) detector at a wavelength of 280 nm. Data were collected at intervals of 0.5 s and evaluated by the AF2000 Control software (version 1.2.0.19). For size analysis of the liposome fraction using the MALLS-detector, a sphere model was used to calculate the radius of gyration (R_g).

The separation channel was equipped with a membrane of regenerated cellulose with a MWCO of 10 kDa and a trapezoidal spacer with an overall area of 31.6 cm² and a height of 500 µm.

A detector flow rate of 1 mL/min and a temperature of 25°C were applied. Samples were injected via a loop injector with a specified volume of 20.31 µL during the focusing step with an injection flow rate of 0.2 mL/min, a cross-flow rate of 4 mL/min and a resulting focus flow rate of 4.8 mL/min over 12 min. After a transition time of 1 min the cross-flow was kept constant at 4 mL/min for 18 min and then reduced under exponential gradients (power 0.3) within 30 min to 0.4 mL/min and within another 10 min to 0.01 mL/min. The cross-flow was kept constant at 0.01 mL/min for 15 min and at 0.00 mL/min for another 4 min to ensure complete sample elution. Samples were collected for further analyses in 1 mL fractions between 18 and 82 min.

Non-separated sample was kept as a reference.

Liquid scintillation counting

In order to quantify liposomal lipid and temoporfin in each collected fraction ^3H and ^{14}C radioactivity was determined by liquid scintillation counting (LSC, Tricarb 2800 TR LSC, PerkinElmer, Rodgau, Germany). Samples were transferred into scintillation vials and mixed with a ready-to-use scintillation cocktail (Rotiszint® eco plus, Carl Roth, Karlsruhe, Germany) in a ratio of 1:2 by vortexing the vials for at least 30 sec. As a reference 20 μL of non-separated samples and 5 μL of the pure liposome samples were mixed with 500 μL buffer and 2 mL cocktail. Radioactivity, expressed as disintegrations per minute (dpm), was measured over 5 min. A blank (500 μL buffer in scintillation cocktail) was subtracted from all other samples.

Data analysis

The obtained elution profiles (radioactivity as percentage of total applied amount for each fraction as function of elution time) were analyzed using the software Peakfit v4.12 (Systat Software Inc., San Jose, California, USA) according to the residuals method. Area of each peak is a measure of the amount of lipid and drug content in the fractions. Mathematica v10.4 (Wolfram Research, Inc., Champaign, IL, USA) was used for further data analysis and modelling.

Results

Characterization of liposomal formulations

Table I summarizes particle size, particle size distribution and mTHPC content of all investigated liposomal formulations. PDIs of about 0.1 indicated a narrow uni-modal size distribution. Particle sizes ranged between 100 to 130 nm in diameters (z-Average).

mTHPC is completely incorporated into the liposomal bilayer. During preparation, we observed a loss of about 10 to 20% of the drug mainly due to absorption onto the extrusion membrane.

Protein binding of non-liposomal mTHPC

Figure 1 shows the plasma protein binding of non-liposomal mTHPC. mTHPC is mainly bound to HDL and LDL, while only smaller portions of the drug were found in the albumin fraction. Approximately 1 to 5% of the drug were recovered in fractions with plasma components larger than LDL (e.g. VLDL). Temoporfin binding to the particular protein fractions was linear within the analyzed concentration range of mTHPC up to 4×10^{-7} mol/mL plasma and no time-dependency was observed up to 12 hours incubation time (data not shown). The following plasma incubation experiments employing liposomes were performed with mTHPC concentrations between 0.06 and 3.6×10^{-7} mol/mL plasma in order to avoid saturation phenomena.

Transfer and stability studies of liposomal formulations in human plasma

AF4 elution profiles of human plasma as well as of plasma liposome mixtures were in accordance with recently published profiles (Holzschuh *et al.*, 2016). Portions of drug were found in four larger fractions, which were previously described as albumin, HDL, LDL and liposomes. The lipid label did not bind to albumin. We were able to recover 94 ± 10 % of ^3H -COE and 84 ± 10 % of ^{14}C -mTHPC (n=215) in the collected fractions. Residues of mTHPC were washed out by the cross-flow or remained on the AF4 membrane.

For the majority of formulations (15 out of 27), incubation experiments were performed with and without addition of torcetrapib. In both cases, mTHPC transfer was well reproducible. In

the following, if not stated otherwise, only results from incubation in CETP-inhibited plasma are displayed (n = 1).

Capability of phospholipid bilayers to host mTHPC: drug to lipid ratio (DLR)

Besides the total drug release of mTHPC we additionally calculated the amount of mTHPC in relation to the amount of lipid label recovered in the liposome fraction. This parameter correlates drug release with liposome stability and hence, enables a prediction of the capability of the vesicles to host the drug within their bilayer. The drug-to-lipid ratios (DLR) were calculated as:

$$DLR = \frac{\text{Portion of drug label in the liposome fraction [\%]}}{\text{Portion of lipid label in the liposome fraction [\%]}} \quad (1)$$

Prior to incubation the value is by definition 1.0 as both labels are incorporated completely into the bilayer. If the drug is released by transfer processes the ratio will decrease. If the drug is released, alternatively, by vesicle disintegration the ratio will ideally be constant as the lipid label is also transferred. A value of 0.6 indicates that the current liposomal drug loading is 60% of the initial drug loading. If no drug is recovered in the liposome fraction, the DLR is 0. A DLR higher than 1.0 is not possible if the lipid label completely remains in the intact liposomes.

The relevance of the DLR can be understood exemplarily with the help of Figures 2 and 3. Only 20% of the entire applied mTHPC is left in the liposome fraction when an EPC/EPG formulation loaded with 8 mol% drug was incubated in human plasma for 120 hours (Figure 2A). However, each intact vesicle still hosts 65% of mTHPC that was originally incorporated into this membrane (Figure 2B). This leads to the conclusion that drug transfer mainly occurs due to vesicle instability and to a lower extent due to transfer processes from intact vesicles to plasma proteins. In contrast, DPPC/DPPG (Figure 3A and B) liposomes with the same drug loading were in general very stable in human plasma and transfer from intact vesicle e.g. by diffusion or collision is the predominant mechanism. Hence, no big differences can be observed between Figures 3A and 3B.

For the following evaluations we therefore consider total drug release and DLR simultaneously.

Effect of drug loading on drug retention within the bilayer

In order to investigate the dependence of drug retention within the liposomal bilayer on the total initial drug loading, fluid EPC/EPG and rigid DPPC/DPPG liposomes were loaded with various amounts of mTHPC. The results are displayed in Figures 2A/B and 3A/B.

mTHPC release from the rigid bilayers was increased for equal drug loadings in comparison to the fluid liposomes. The presence of mTHPC showed no significant effect on liposome stability over the investigated incubation time range. More than 80% of the vesicles were still intact after 48 hours for all DPPC/DPPG formulations and more than 70% after 120 hours, respectively while only approximately 50% and 30% of the lipid label were found in the liposome fraction of EPC/EPG liposomes after the same incubation times (data not shown).

However, the bilayer capability to host mTHPC in the presence of plasma is strongly dependent on drug loading. For instance, EPC/EPG liposomes with an initial drug loading of 0.8 (formulation 1) and 4 mol% (formulation 2) can hold 90% of the mTHPC in the bilayer of intact vesicles over 48 hours whereas this value drops to 70% for an 8 mol % drug loading. Drug release is also retarded for DPPC/DPPG liposomes when the drug loading is decreased. However, in comparison to fluid liposomes the bilayer is still less capable to hold the drug, and only 20% of the initial mTHPC loading remains in the liposomes after 48 hours.

Cholesterol and PEGylation as strategies to increase liposome stability

PEGylation and incorporation of cholesterol into the lipid membrane are two well-established strategies to increase liposome stability in human plasma. Both approaches lead to higher vesicle integrity for the fluid EPC/EPG formulation especially in the first 12 hours.

Employment of cholesterol

Liposome stability correlated with the amount of cholesterol employed in the lipid bilayer. The more cholesterol was added to the membrane the more vesicles remained intact over the incubation time. Addition of 22.5 and 30 mol% cholesterol to a fluid EPC/EPG bilayer e.g. lead to 50% more intact vesicles after 12 hours incubation time in plasma. However, cholesterol had a reverse effect on the mTHPC retention in the bilayer (Figure 2C and 2D). The more cholesterol was incorporated into the lipid membrane the higher was the total drug release. In

addition, the ability to host mTHPC within the bilayer decreased with increasing amounts of cholesterol. In case of 4 mol% mTHPC contained in EPC/EPG liposomes, DLR decreased within the first 4 hours and remained constant thereafter for longer incubation times (Figure 2D).

Cholesterol also increased the stability of DPPC/DPPG liposomes. Nearly all vesicles remained intact in human plasma when at least 15 mol% was present in the membrane. Yet, similar to the fluid formulation, drug release from the rigid bilayer was increased with increasing amounts of cholesterol in the lipid membrane. Note that, not only does the capability of the bilayer to hold mTHPC decrease but the transfer rate is too enhanced. While the plain 4 mol% formulation reaches an apparent DLR plateau after 48 hours, this time is reduced to 4 to 8 hours when 22.5 or 30 mol% cholesterol were employed, respectively (Figure 3D).

PEGylation

PEGylation of the fluid EPC/EPG liposomes containing 8 mol% mTHPC also increased liposome stability but exhibited little impact on the corresponding DLR (Figure 2F). On the other hand, the amount of mTHPC recovered in the liposome fraction is even increased due to higher vesicle stability. Note that, the results were dependent on the PEG-chain length. The longer the PEG-chain was the more vesicles remained intact and the less mTHPC was transferred to plasma proteins (Figure 2E). This effect was most pronounced within the first 12 hours where the PEGylated formulation showed an increased stability of up to 20%.

In contrast, PEGylated DPPC/DPPG formulations displayed faster drug releases and lower DLR with increasing PEG-chain length. The differences were most pronounced for short incubation times while only minor variations were found at later times (Figure 3E and 3F).

Effect of lipid composition

Liposomes with varying lipid compositions were loaded with 8 mol% mTHPC. Vesicle stability and fractions of the remaining mTHPC in the liposomes were found to depend on the bilayer composition. Experimental results are displayed in Figure 4A and 4B. The corresponding DLRs are shown in Figure 4C.

Effect of saturation degree of the fatty acid chains

DOPC/DOPG, POPC/POPG and DPPC/DPPG are phospholipids with the same alkyl chain length but a different degree of fatty acid saturation. Liposomes composed of these mixtures were investigated with regard to their behavior in human plasma. POPC/POPG liposomes were less stable than DPPC/DPPG liposomes but more stable than EPC/EPG liposomes and showed a similar capability to hold mTHPC in the bilayer as EPC/EPG liposomes. The amount of drug found in the liposome fraction of DOPC/DOPG liposomes was also higher in comparison to the rigid DPPC/DPPG liposomes. However, DLRs for this formulation were above 1 for all investigated time points, indicating that the COE lipid label did not remain in the vesicles and was partly released. With regard to the amount of mTHPC that was transferred to plasma proteins it was observed that among the fluid formulations the POPC/POPG bilayer showed a slightly lower drug release (39% after 48 hours) than the EPC/EPG (35%) or DOPC/DOPG (30%) membranes. In contrast, lower amounts of mTHPC were recovered in DPPC/DPPG liposomes (20%).

Variation of the fatty acid chain length

To investigate the effect of the fatty acid chain length, 8 mol% mTHPC containing liposomes composed of DMPC/DMPG (14:0), DPPC/DPPG (16:0) and DSPC/DSPG (18:0) were incubated in human plasma. DSPC liposomes were the most stable formulation; they exhibited the lowest drug release. Liposomes composed of DMPC were less stable and retained the lowest portion of mTHPC in the bilayer for all incubation times among all investigated unmodified formulations containing 8 mol% mTHPC. These vesicles showed a tendency to shrink considerably from R_G values of approximately 35 nm to less than 25 nm before disintegrating. Additionally, an overlap with the LDL peak was observed for these smaller vesicular structures.

Comparison of the release profiles of DPPC/DPPG and DSPC/DSPG liposomes employing various amounts of mTHPC

In contrast to the above-mentioned results for 8 mol% containing DPPC/DPPG and DSPC/DSPG liposomes, DSPC/DSPG liposomes containing 0.8 mol% mTHPC showed a

faster initial drug release than DPPC/DPPG liposomes with the same drug loading (Figure 5). This trend reversed between 12 and 24 hours incubation time. After 24 hours less portions of mTHPC remained in DPPC/DPPG liposomes than in DSPC/DSPG vesicles.

Incorporation stability of ^3H -COE

The CETP inhibitor torcetrapib was added to human plasma prior each set of experiment to avoid an induced release of ^3H -COE out of the liposome membrane. For selected formulations the incubation in human plasma was also performed without the addition of torcetrapib (Figure 6). Liposomes composed of phospholipids with unsaturated fatty acids showed in these cases an additional release of ^3H -COE in human plasma. In particular, this effect was observed for EPC/EPG, POPC/POPG and DOPC/DOPG liposomes. Liposomes composed of SPC also showed this effect (data not shown). PEGylation of EPC/EPG liposomes and employment of cholesterol were able to delay this effect although it still occurred (data not shown). CETP inhibition by torcetrapib was not able to prevent COE release out of the liposomal bilayer when DOPC and DOPG were used as main lipids.

In contrast, formulations composed of phospholipids with two saturated fatty acids (DMPC, DPPC, DSPC) did not show any significant COE release caused by CETP.

Discussion

mTHPC is known to show a high affinity to lipophilic plasma proteins such as HDL, LDL, VLDL and lipoprotein(a) whereas only minor amounts of the drug were bound to soluble proteins, mainly albumin (17%) (Michael-Titus *et al.*, 1995). Distribution of the LDL-like lipoprotein(a) in human plasma is heterogeneous and molecular weights vary from 2×10^6 up to 10^{10} Da (März *et al.*, 1993). In our studies, mTHPC was recovered in four distinct plasma protein fractions recently identified as: a fraction of smaller proteins (e.g. albumin), HDL, LDL, and VLDL (Holzschuh *et al.*, 2016). Although the latter fraction overlaps in size with the liposome fraction, the data shown in Figure 1 indicates that VLDL plays a minor role in our incubation studies. Moreover, the binding of Temoporfin to proteins was found to be linear within the investigated concentration range, thus implying that no saturation effects are expected in these liposome incubation studies. Comparable low binding to albumin might result from analytical limitations such as flow conditions during separation and adsorption of the drug on the membrane. However, similar studies employing SEC did also not observe a significant binding of mTHPC to albumin in human plasma (Reshetov *et al.*, 2012, Decker *et al.*, 2013b, Kaess and Fahr, 2014). Typically, less than 5% of the recovered mTHPC was found in the albumin fraction when liposomes were incubated in human plasma. Interestingly, this amount is kept largely constant over the whole incubation time and depends on the light exposition of the sample. Hence, we decided to completely neglect albumin in the following considerations.

Experiments were performed in plasma from a single healthy donor. Previous studies have shown that differences in vesicle stability were minor when liposomes were incubated in human plasma obtained from different healthy volunteers (Holzschuh *et al.*, 2016). For selected formulations, we also investigated the influence of plasma origin on mTHPC transfer and observed only minor deviations (data not shown).

When liposomes get in contact with plasma proteins, the drug molecules hosted by liposomes can be released by a variety of mechanisms as, for example, diffusion and collision. In addition, vesicles can be disintegrated by the phospholipid transfer to lipoproteins, an action mostly

promoted by transport proteins such as the phospholipid transfer protein (PLTP) (Damen *et al.*, 1980). In general, HDL and HDL-bound proteins seem to be most accountable for vesicle disruption while LDL and VLDL only play a minor role (Bonte and Juliano, 1986). Vesicle disintegration also causes drug release, a process that can be reduced by increasing the membrane rigidity upon the employment of cholesterol (Damen *et al.*, 1981) or by the usage of phospholipids (Allen, 1981) with higher melting temperature. Studies on mTHPC-containing liposomes have shown, however, that these last two options decrease the capability of mTHPC to be retained in the bilayer (Hefesha *et al.*, 2011, Decker *et al.*, 2013b). In such a complex scenario, the understanding of the drug release over time, including the factors that affect this process, are crucial for the prediction of the pharmacokinetics. Here, we systematically studied the effect of the membrane composition on the amount of mTHPC bound to plasma proteins and developed a theoretical model to evaluate our results.

Based on the experimental evidence that HDL and LDL are the most relevant acceptors of mTHPC, in our theoretical model we assume that all mTHPC stored in the liposomes can be transferred only to HDL and LDL. Additionally, we consider the liposomes as a system composed of two compartments, here called 'inner' and 'outer', and respectively identified by index i and o . For example, the fractional amount of drug stored in the inner and outer compartments as function of time t is denoted by $M_i(t)$ and $M_o(t)$; see Figure 7.

The inner compartment likely represents the core of the hydrocarbon chain region where mTHPC is more tightly bound and, hence, one can expect that the drug contained in the inner compartment (M_i) is slowly transferred to the outer one; we model such reaction by a rate constant k_1 . On the other hand, the outer compartment, which likely represents the interfacial bilayer region, has more loosely associated mTHPC, thus allowing the drug to be rapidly released by vesicle collisions or disintegration. In our model, the outer compartment transfers mTHPC to HDL and LDL with rate constants k_2 and k_3 , respectively. The "back-reactions" from HDL and LDL to the outer compartment can be characterized by another set of rate constants, k_4 and k_5 , respectively. Based on these definitions, the mass conservation of mTHPC implies

$$M_i(t = 0) = M_i(0) ; M_o(t = 0) = M_o(0) \quad (2)$$

$$M_i(0) + M_o(0) = 1 \quad (3)$$

$$M_{HDL}(t = 0) = M_{LDL}(t = 0) = 0 \quad (4)$$

$$M_i(t) + M_o(t) + M_{HDL}(t) + M_{LDL}(t) = 1 \quad (5)$$

Large values for M_o , k_1 , k_2 and k_3 are indicators of an enhanced drug release. Initially, we will assume that drug transferred to HDL and LDL will remain there (sink-like behavior), implying $k_4 = k_5 = 0$. We refer to this case as the *3k-model*. Following Figure 7 the following time behaviors emerge:

- for the inner liposome compartment:

$$M_i(t) = M_i(0)e^{-k_1 t} \quad (6)$$

- for the outer liposome compartment:

$$M_o(t) = \frac{[-e^{-k_1 t} k_1 M_i(0) + e^{-(k_2 + k_3)t} (k_1 - M_o(0) \{k_2 + k_3\})]}{k_1 - k_2 - k_3} \quad (7)$$

- for HDL:

$$M_{HDL}(t) = \frac{k_2 [-e^{-k_1 t} M_i(0) (k_2 + k_3) - (k_1 - k_2 - k_3) + e^{-(k_2 + k_3)t} \{k_1 - M_o(0) (k_2 + k_3)\}]}{(k_2 + k_3) (-k_1 + k_2 + k_3)} \quad (8)$$

- for LDL:

$$M_{LDL}(t) = \frac{k_3 [-e^{-k_1 t} (k_2 + k_3) M_i(0) - (k_1 - k_2 - k_3) + e^{-(k_2 + k_3)t} \{-(k_2 + k_3) M_o(0) + k_1\}]}{(k_2 + k_3) (-k_1 + k_2 + k_3)} \quad (9)$$

For each composition of phosphatidylcholine and phosphatidylglycerol, k_1 , k_2 and k_3 were calculated by minimizing the cumulative difference square between the theoretical curves (eqs. 6-9) and the values measured experimentally. With these constants established, we used the same minimization procedure to determine the initial amounts, $M_i(0)$ and $M_o(0)$ for each specific formulation. The results are displayed in Table II. With $k_4 = k_5 = 0$ all drug will eventually be transferred to either HDL or LDL. However, our experimental data typically reveal a plateau at long incubation times, with some drug remaining in the liposomes. To account for the plateau, we also consider an extension of our model where k_4 and k_5 are non-vanishing. We refer to this extended model as *5k-model*. Figure 8 shows two exemplary fits for a DPPC/DPPG formulation containing 8 mol% mTHPC (Foslip®) and the PEGylated Fospeg®. Solid and dashed curves correspond to the 3k and 5k models, respectively. The fit of our 3k and 5k

models reveals reasonable agreement with the experimentally observed trends. This, in fact, is a characteristic feature for all data sets that we have modeled. While the 5k model necessarily yields better agreement, it also contains two more fitting parameters. In contrast, the 3k-model preserves all the physically relevant features with only 3 rate constants. We thus argue that the 3k-model represents the more robust modelling approach. Consequently, our following discussion focuses on the 3k-model.

Results for the 5k-model as well as a compilation of all investigated formulations are provided in the supplementary information.

It was recently demonstrated that the mTHPC release is enhanced with the increase of the main transition temperature T_C of the liposomal bilayer (Hefesha *et al.*, 2011, Decker *et al.*, 2013a, Decker *et al.*, 2013b). This is associated with an inward displacement of mTHPC into the fluid membrane while the photosensitizer is displaced toward in a rigid membrane (Lavi *et al.*, 2002, Reshetov *et al.*, 2011). Our calculated release constants in Table II are consistent with the notion that a rigid membrane is less able to retain mTHPC within the bilayer core and that mTHPC gets released to a higher extent upon increasing membrane rigidity.

For protein bound mTHPC in rats *in vivo*, Decker *et al.* reported elimination constants of EPC/EPG formulations different by a factor of 1.8 from those obtained when used DPPC/DPPG (Decker *et al.*, 2013a). In both cases, they had an 8 mol% content of mTHPC (Decker *et al.*, 2013a). When we apply our model to the same formulations, we find that the sum of k_2 and k_3 differs by a factor of 3. As rat plasma is known to have lower levels of PLTP (Speijer *et al.*, 1991), liposome disintegration is less pronounced than in human plasma. We also observed that vesicle destruction is one of the main release mechanisms for mTHPC in EPC/EPG formulations but it plays a minor role for rigid vesicles. Therefore, we expect that the rat model underestimates drug release from fluid liposomes and that our values should be lower. The plain data (e.g. Figure 2A and 3A) reveal similar results as the mentioned *in vivo* data. We conclude that other parameters than just the sum of k_2 and k_3 are necessary for the prediction of drug release.

Decker et al. have also shown that mTHPC has a lower affinity to membranes containing cholesterol (Decker *et al.*, 2013b). Antunes-Madeira and Madeira (Antunes-Madeira and Madeira, 1984) observed that addition of cholesterol into a bilayer changed the position of parathion due to changes in lipid packaging of the membrane and competition for free space. We assume that the presence of cholesterol pushes mTHPC to the surface of the bilayer and therefore enhances drug release. This is confirmed by the observed increase of $M_0(0)$ for higher amounts of cholesterol in a DPPC-bilayer, and the same mechanism also occurs in EPC/EPG-liposomes. However, addition of cholesterol to a fluid bilayer also improves plasma stability (Damen *et al.*, 1981, Sulkowski *et al.*, 2005). As a higher vesicle stability influences $M_0(0)$ in the opposite way, the observed effect is less pronounced for the fluid than for the rigid bilayer.

DLRs for EPC/EPG- and DPPC/DPPG-liposomes showed that PEGylation of the surface reduces the capability of the bilayer to host the drug (Figure 2F and 3F). In line with this, our model predicted an increase of $M_0(0)$ for a DPPC/DPPG formulation. Reshetov et al. explained this phenomenon with the solubility of mTHPC in the PEG-shell which may facilitate a higher initial drug release (Reshetov *et al.*, 2011). Besides that, PEGylated lipids tend to form micelles which can promote liposomal drug release additionally (Kenworthy *et al.*, 1995, Sandstrom *et al.*, 2007). Indeed, after 0.93 hours only 50% of the initial mTHPC amount remained in the liposome fraction for Fospeg®, whereas it took 1.19 hours for the non-PEGylated formulation to reach the same value. This effect is less pronounced for longer incubation times. Decker et al. also observed in rats *in vivo* that PEGylation enhances drug release from the bilayer (Decker *et al.*, 2013a). Reshetov et al. measured higher mTHPC plasma levels for Fospeg® in mice. However, in that case the PEGylated formulation showed an additional higher stability than Foslip® which can explain the different findings. We also observed lower DLR values when the surface of EPC/EPG liposomes was modified with PEGylated lipids. However, we calculated lower $M_0(0)$ values for these formulations. We conclude that the improvement of plasma stability due to PEGylation has a bigger influence on the total drug release than

changes in the location of the drug in the membrane whereas it was the opposite case when cholesterol was employed.

Porphyrines tend to aggregate in aqueous media as well as in liposomal bilayers (Postigo *et al.*, 2004, Reshetov *et al.*, 2011). The amount of aggregates increases with drug loading. Higher $M_o(0)$ values for higher drug loadings indicate that the bilayer is positioned to expel drug molecules to external lipophilic acceptors such as lipoproteins in order to dissolve aggregates in the bilayer. This effect is more pronounced for rigid than for fluid membranes. Due to higher lipid packaging, they offer less space (Yun, 2003) for the drug and could facilitate aggregation. At the same time, conversion of aggregates into monomers might be hindered for the same reasons.

Conclusions

Total drug release from liposomes in human plasma is an essential parameter for the prediction of pharmacokinetic behavior *in vivo*. It depends on the capability of a membrane to hold the drug within the bilayer and on the stability of the vesicles. DLR is a helpful tool to estimate the former and to adjust the membrane composition to the required properties. In general, stable vesicles, which can incorporate the drug for long times can prolong plasma circulation time. In case of mTHPC, we could show that the drug fits better into a fluid bilayer and that the release rate decreased with lower drug loadings. Stability of these vesicles was increased by surface PEGylation and the presence of cholesterol. The latter case led to an enhanced total drug release while retardation was observed when the fluid bilayer was PEGylated. For rigid liposomes both modifications resulted in higher amounts of mTHPC bound to plasma proteins. Summarizing, our *in vitro* studies suggest a fluid PEGylated formulation provides the highest plasma levels of liposomal mTHPC corresponding to the highest functional effect *in vivo*.

AF4 is a fast separation tool for the fractionation of albumin, HDL, LDL and liposomes. By radioactive labeling of the drug and a lipid marker we were able to measure drug transfer and vesicle stability simultaneously. For mTHPC this method has the advantage of not suffering from photoinduced instability. The lipid marker COE is substrate of CETP (Holzschuh *et al.*, 2016). The COE transfer caused by this transfer protein increases with increasing bilayer

fluidity, especially when the lipophilic tail contains unsaturated fatty acids. CETP inhibition by torcetrapib was able to reduce this effect. However, for DOPC which contains two unsaturated fatty acids pre-incubation of plasma with torcetrapib was not able to completely inhibit the transfer.

Acknowledgements

The authors report no declarations of interest. However, the authors thank Biolitec Biomedical Technology GmbH (Jena, Germany) for kindly providing mTHPC and ^{14}C -mTHPC, Lipoid GmbH (Ludwigshafen, Germany) for the donation of several phospholipids and IOMC Jena for using their facilities, without these we could not have performed the AF4 measurements. G.V.B. acknowledges a doctoral scholarship from CAPES Foundation/Brazil Ministry of Education (Grant No. 9466/13-4). This study was supported by a generous grant from the Phospholipid Research Center (Heidelberg, Germany).

References

- Allen, T.M., 1981. A Study of Phospholipid Interactions between High-Density Lipoproteins and Small Unilamellar Vesicles. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 640, 385-397.
- Allen, T.M. & Cullis, P.R., 2013. Liposomal drug delivery systems: from concept to clinical applications. *Adv Drug Deliv Rev*, 65, 36-48.
- Antunes-Madeira, M.C. & Madeira, V.M.C., 1984. Partition of Parathion in Synthetic and Native Membranes. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 778, 49-56.
- Blume, G. & Cevc, G., 1993. Molecular Mechanism of the Lipid Vesicle Longevity In vivo. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1146, 157-168.
- Bonte, F. & Juliano, R.L., 1986. Interactions of liposomes with serum proteins. *Chem Phys Lipids*, 40, 359-372.
- Chen, M., Liu, X. & Fahr, A., 2011. Skin penetration and deposition of carboxyfluorescein and temoporfin from different lipid vesicular systems: In vitro study with finite and infinite dosage application. *Int J Pharm*, 408, 223-234.
- Damen, J., Dijkstra, J., Regts, J. & Scherphof, G., 1980. Effect of lipoprotein-free plasma on the interaction of human plasma high density lipoprotein with egg yolk phosphatidylcholine liposomes. *Biochim Biophys Acta*, 620, 90-99.
- Damen, J., Regts, J. & Scherphof, G., 1981. Transfer and exchange of phospholipid between small unilamellar liposomes and rat plasma high density lipoproteins. Dependence on cholesterol content and phospholipid composition. *Biochim Biophys Acta*, 665, 538-545.
- Decker, C., Schubert, H., May, S. & Fahr, A., 2013a. Pharmacokinetics of temoporfin-loaded liposome formulations: Correlation of liposome and temoporfin blood concentration. *Journal of Controlled Release*, 166, 277-285.
- Decker, C., Steiniger, F. & Fahr, A., 2013b. Transfer of a lipophilic drug (temoporfin) between small unilamellar liposomes and human plasma proteins: influence of membrane

- composition on vesicle integrity and release characteristics. *Journal of Liposome Research*, 23, 154-165.
- Hefesha, H., Loew, S., Liu, X., May, S. & Fahr, A., 2011. Transfer mechanism of temoporfin between liposomal membranes. *J Control Release*, 150, 279-86.
- Holzschuh, S., Kaess, K., Fahr, A. & Decker, C., 2016. Quantitative In Vitro Assessment of Liposome Stability and Drug Transfer Employing Asymmetrical Flow Field-Flow Fractionation (AF4). *Pharm Res*, 33, 842-55.
- Kaess, K. & Fahr, A., 2014. Liposomes as solubilizers for lipophilic parenteral drugs: Transfer of drug and lipid marker to plasma proteins. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 116, 1137-1144.
- Kenworthy, A.K., Simon, S.A. & McIntosh, T.J., 1995. Structure and phase behavior of lipid suspensions containing phospholipids with covalently attached poly(ethylene glycol). *Biophys J*, 68, 1903-1920.
- Klibanov, A.L., Maruyama, K., Torchilin, V.P. & Huang, L., 1990. Amphipathic polyethyleneglycols effectively prolong the circulation time of liposomes. *FEBS Lett*, 268, 235-237.
- Lavi, A., Weitman, H., Holmes, R.T., Smith, K.M. & Ehrenberg, B., 2002. The Depth of Porphyrin in a Membrane and the Membrane's Physical Properties Affect the Photosensitizing Efficiency. *Biophysical Journal*, 82, 2101-2110.
- März, W., Beckmann, A., Scharnagl, H., Siekmeier, R., Mondorf, U., Held, I., Schneider, W., Preissner, K.T., Curtiss, L.K. & Gross, W., 1993. Heterogeneous lipoprotein (a) size isoforms differ by their interaction with the low density lipoprotein receptor and the low density lipoprotein receptor-related protein/alpha 2-macroglobulin receptor. *FEBS Lett*, 325, 271-275.
- Michael-Titus, A.T., Whelpton, R. & Yaqub, Z., 1995. Binding of temoporfin to the lipoprotein fractions of human serum. *Br J Clin Pharmacol*, 40, 594-597.
- Papahadjopoulos, D., Allen, T.M., Gabizon, A., Mayhew, E., Matthay, K., Huang, S.K., Lee, K.D., Woodle, M.C., Lasic, D.D. & Redemann, C., 1991. Sterically stabilized liposomes:

- improvements in pharmacokinetics and antitumor therapeutic efficacy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88, 11460-11464.
- Petersen, S., Fahr, A. & Bunjes, H., 2010. Flow cytometry as a new approach to investigate drug transfer between lipid particles. *Mol Pharm*, 7, 350-363.
- Postigo, F., Mora, M., De Madariaga, M.A., Nonell, S. & Sagrista, M.L., 2004. Incorporation of hydrophobic porphyrins into liposomes: characterization and structural requirements. *Int J Pharm*, 278, 239-254.
- Reshetov, V., Kachatkou, D., Shmigol, T., Zorin, V., D'hallewin, M.A., Guillemin, F. & Bezdetnaya, L., 2011. Redistribution of meta-tetra(hydroxyphenyl)chlorin (m-THPC) from conventional and PEGylated liposomes to biological substrates. *Photochem Photobiol Sci*, 10, 911-919.
- Reshetov, V., Lassalle, H.P., Francois, A., Dumas, D., Hupont, S., Grafe, S., Filipe, V., Jiskoot, W., Guillemin, F., Zorin, V. & Bezdetnaya, L., 2013. Photodynamic therapy with conventional and PEGylated liposomal formulations of mTHPC (temoporfin): comparison of treatment efficacy and distribution characteristics in vivo. *Int J Nanomedicine*, 8, 3817-3831.
- Reshetov, V., Zorin, V., Siupa, A., D'hallewin, M.A., Guillemin, F. & Bezdetnaya, L., 2012. Interaction of liposomal formulations of meta-tetra(hydroxyphenyl)chlorin (temoporfin) with serum proteins: protein binding and liposome destruction. *Photochem Photobiol*, 88, 1256-1264.
- Sandstrom, M.C., Johansson, E. & Edwards, K., 2007. Structure of mixed micelles formed in PEG-lipid/lipid dispersions. *Langmuir*, 23, 4192-4198.
- Speijer, H., Groener, J.E., Van Ramshorst, E. & Van Tol, A., 1991. Different locations of cholesteryl ester transfer protein and phospholipid transfer protein activities in plasma. *Atherosclerosis*, 90, 159-168.
- Sulkowski, W.W., Pentak, D., Nowak, K. & Sulkowska, A., 2005. The influence of temperature, cholesterol content and pH on liposome stability. *Journal of Molecular Structure*, 744, 737-747.

- Van Hoogevest, P., Leigh, M. & Fahr, A., 2013. Liposomes as Intravenous Solubilizers for Poorly Water-Soluble Drugs. *Drug Delivery Strategies for Poorly Water-Soluble Drugs*. John Wiley & Sons Ltd, 37-66.
- Wagner, M., Holzschuh, S., Traeger, A., Fahr, A. & Schubert, U.S., 2014. Asymmetric Flow Field-Flow Fractionation in the Field of Nanomedicine. *Analytical Chemistry*, 86, 5201-5210.
- Xie, H., Svenmarker, P., Axelsson, J., Grafe, S., Kyriazi, M., Bendsoe, N., Andersson-Engels, S. & Svanberg, K., 2015. Pharmacokinetic and biodistribution study following systemic administration of Fospeg(R)--a Pegylated liposomal mTHPC formulation in a murine model. *J Biophotonics*, 8, 142-152.
- Yun, H.J.C., Young Wook; Kim, Nam Jeong; Sohn, Dae Won, 2003. Physicochemical properties of phosphatidylcholine (PC) monolayers with different alkyl chains, at the air/water interface. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 24, 377-383.

Tables

Table I. Liposome composition, mTHPC loading, particle size and PDI of all investigated formulations. Amounts of drug, cholesterol and PEGylated lipids are given in mol% based on molar concentrations of the phospholipids.

No.	Membrane composition	mTHPC loading [mol%]		z-Average [nm]	PDI
		nominal	actual		
EPC/EPG (9:1 (w/w), 20 mg/ml phospholipid)					
	Unmodified	0.8	0.65	97 ± 1	0.07
2	Unmodified	4	3.48	103 ± 1	0.09
3	Unmodified	8	7.42	113 ± 3	0.09
4	+ 7.5 mol% Cholesterol	4	3.38	102 ± 1	0.07
5	+ 15 mol% Cholesterol	4	3.24	101 ± 1	0.08
6	+ 22.5 mol% Cholesterol	4	3.01	113 ± 1	0.09
7	+ 30 mol% Cholesterol	0.8	0.66	110 ± 1	0.07
8	+ 30 mol% Cholesterol	4	3.17	110 ± 1	0.07
9	+ 2.62 mol% PEG ₇₅₀ -DSPE	8	6.86	100 ± 1	0.09
10	+ 2.62 mol% PEG ₂₀₀₀ -DSPE	8	6.77	91 ± 3	0.10
DPPC/DPPG (9:1 (w/w), 20 mg/ml phospholipid)					
11	Unmodified	0.2	n.d.		
12	Unmodified	0.8	0.62	90 ± 1	0.09
13	Unmodified	2	1.48	99 ± 1	0.09
14	Unmodified	4	3.42	89 ± 1	0.08
15	Unmodified	8	7.40	89 ± 1	0.07
16	Unmodified	12	9.24	110 ± 1	0.09
17	+ 7.5 mol% Cholesterol	4	3.23	93 ± 1	0.08
18	+ 15 mol% Cholesterol	4	3.42	104 ± 1	0.07
19	+ 22.5 mol% Cholesterol	4	3.22	107 ± 1	0.07
20	+ 30 mol% Cholesterol	0.8	0.63	97 ± 1	0.07
21	+ 30 mol% Cholesterol	4	3.39	104 ± 1	0.07

22	+ 2.62 mol% PEG ₇₅₀ -DSPE	8	6.51	99 ± 1	0.05
23	+ 2.62 mol% PEG ₂₀₀₀ -DSPE	8	6.82	89 ± 1	0.07
DMPC/DMPG (9:1 (w/w), 20 mg/ml phospholipid)					
24	Unmodified	8	7.05	85 ± 1	0.09
DOPC/DOPG (9:1 (w/w), 20 mg/ml phospholipid)					
25	Unmodified	8	6.86	104 ± 1	0.08
DSPC/DSPG (9:1 (w/w), 20 mg/ml phospholipid)					
26	Unmodified	0.8	0.62	98 ± 1	0.06
27	Unmodified	8	6.49	93 ± 1	0.07
POPC/POPG (9:1 (w/w), 20 mg/ml phospholipid)					
28	Unmodified	8	6.85	100 ± 2	0.11

Table II. Transfer constants k_{1-3} for various lipid compositions and the corresponding $M_i(0)$ and $M_o(0)$ for the investigated liposome formulations.

No.	Membrane composition	mTHPC [%]	3k-model	
			M _i (0) [%]	M _o (0) [%]
EPC/EPG (9:1 (w/w), 20 mg/ml phospholipid)				
3k-model: k1= 0.0054 k2= 0.3693 k3= 0.1471				
1	Unmodified	0.8	63.36	36.64
2	Unmodified	4	53.31	46.69
3	Unmodified	8	45.68	54.32
4	+ 7.5 mol% Cholesterol	4	52.36	47.64
5	+ 15 mol% Cholesterol	4	42.56	57.44
6	+ 22.5 mol% Cholesterol	4	41.51	58.49
7	+ 30 mol% Cholesterol	0.8	38.41	61.59
8	+ 30 mol% Cholesterol	4	29.17	70.83
9	+ 2.62 mol% PEG ₇₅₀ -DSPE	8	50.46	49.54
10	+ 2.62 mol% PEG ₂₀₀₀ -DSPE	8	54.59	45.41
DPPC/DPPG (9:1 (w/w), 20 mg/ml phospholipid)				
3k-model: k1= 0.0196 k2= 1.1346 k3= 0.4303				
11	Unmodified	0.2	98.88	1.12
12	Unmodified	0.8	84.13	15.87
13	Unmodified	2	73.80	26.20
14	Unmodified	4	67.77	32.23
15	Unmodified	8	41.10	58.90
16	Unmodified	12	37.63	62.37
17	+ 7.5 mol% Cholesterol	4	49.48	50.52
18	+ 15 mol% Cholesterol	4	34.52	65.48
19	+ 22.5 mol% Cholesterol	4	29.95	70.05
20	+ 30 mol% Cholesterol	0.8	20.02	79.98
21	+ 30 mol% Cholesterol	4	7.93	92.07
22	+ 2.62 mol% PEG ₇₅₀ -DSPE	8	39.82	60.18

23	+ 2.62 mol% PEG ₂₀₀₀ -DSPE	8	34.68	65.33
DMPC/DMPG (9:1 (w/w), 20 mg/ml phospholipid)				
3k-model: k1= 0.0179 k2= 0.7557 k3= 0.2761				
24	Unmodified	8	17.29	82.71
DOPC/DOPG (9:1 (w/w), 20 mg/ml phospholipid), with inhibitor				
3k-model: k1= 0.0110 k2= 0.6537 k3= 0.1510				
25	Unmodified	8	52.02	47.98
DOPC/DOPG (9:1 (w/w), 20 mg/ml phospholipid), without inhibitor				
3k-model: k1= 0.0096 k2= 0.5622 k3= 0.1318				
25	Unmodified	8	49.19	50.81
DSPC/DSPG (9:1 (w/w), 20 mg/ml phospholipid), without inhibitor				
3k-model: k1= 0.0088 k2= 1.7052 k3= 0.3484				
26	Unmodified	0.8	72.29	27.71
27	Unmodified	8	57.56	42.44
POPC/POPG (9:1 (w/w), 20 mg/ml phospholipid)				
3k-model: k1= 0.0071 k2= 0.8685 k3= 0.1469				
28	Unmodified	8	56.43	43.57

Figures

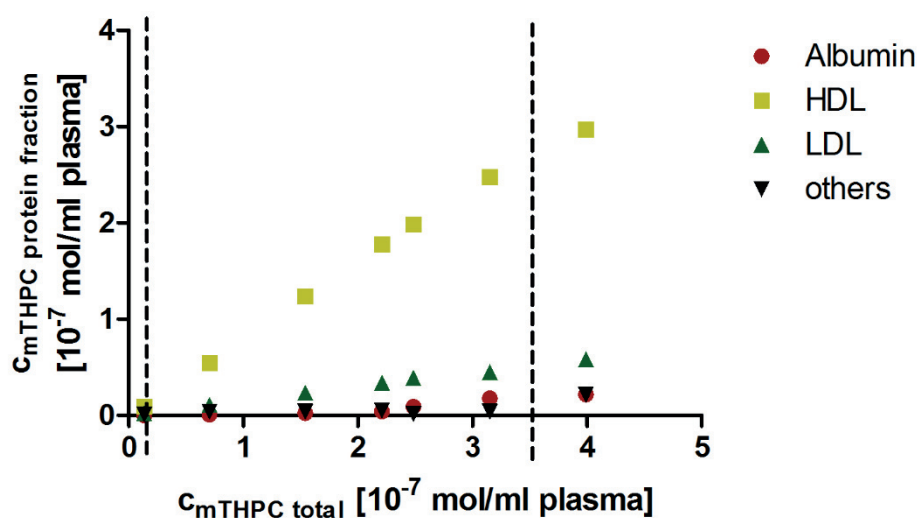


Figure 1: Protein binding of mTHPC. Equivalent amounts of an ethanolic mTHPC solution were incubated in human plasma for 1 hour at 37°C. Samples were subsequently fractionated with AF4. Protein binding to the according fractions was linear within the analyzed concentration range. The vertical lines represent the range of total liposomal mTHPC concentration used in the plasma incubation studies.

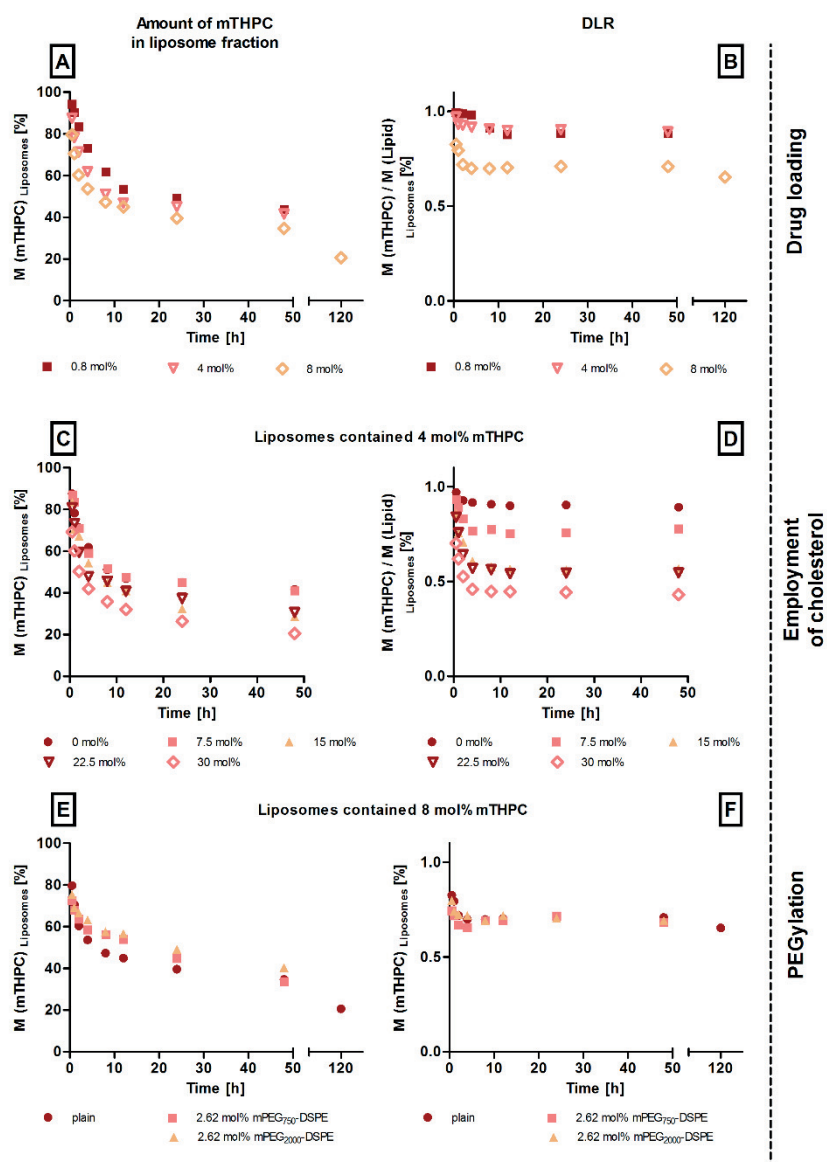


Figure 2: Effect of (A, B) drug loading, (C, D) cholesterol addition and (E, F) PEGylation on mTHPC retention in fluid EPC/EPG liposomes. The total amount of mTHPC recovered in the liposome fraction (left) as well as the relative amount of mTHPC per lipid remaining in the liposome fraction (DLR, right) after various incubation times is displayed. A DLR value of 1 indicates that the initial drug loading is kept. No drug remaining in intact liposomes corresponds to a ratio of 0. Cholesterol was employed into liposomes containing 4 mol% mTHPC. Investigations on PEGylation were performed with liposomes loaded with 8 mol% mTHPC.

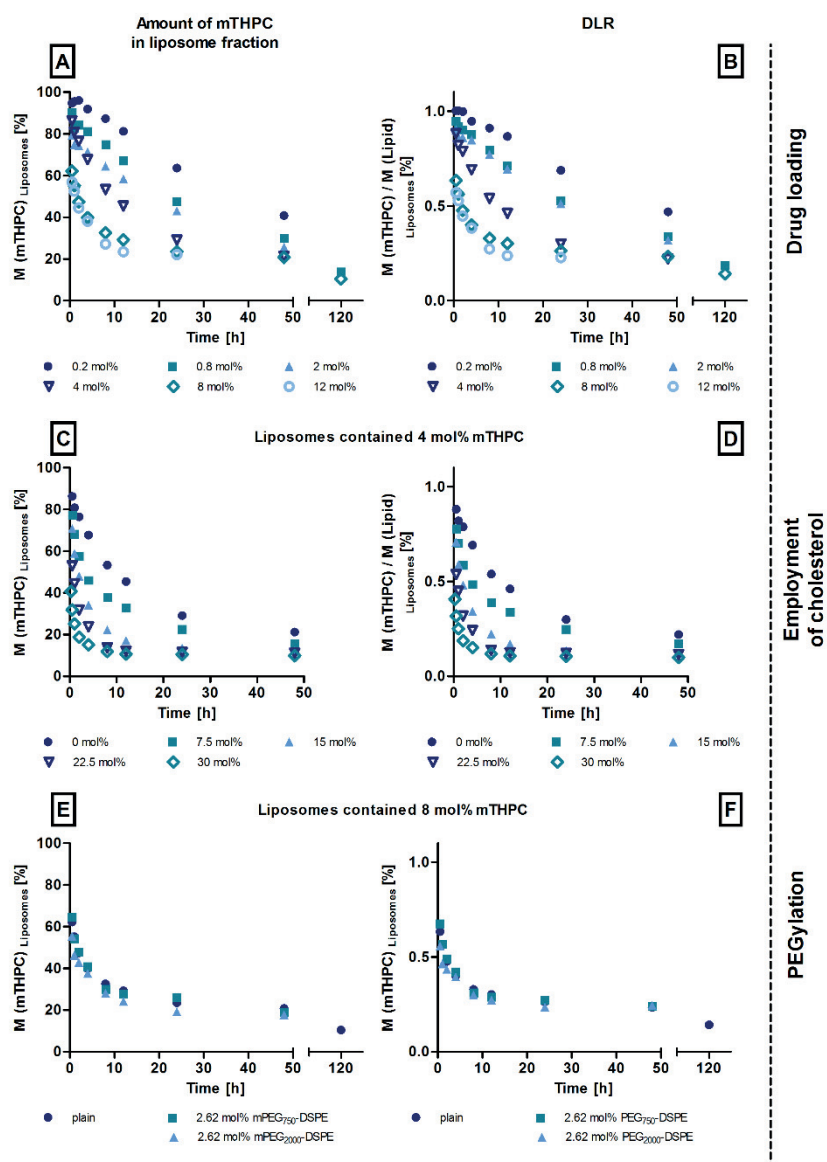


Figure 3: Effect of (A, B) drug loading, (C, D) cholesterol addition and (E, F) PEGylation on mTHPC retention in rigid DPPC/DPPG liposomes. The total amount of mTHPC recovered in the liposome fraction (left) as well as the relative amount of mTHPC per lipid remaining in the liposome fraction (DLR, right) after various incubation times is displayed. A DLR value of 1 indicates that the initial drug loading is kept while no drug remaining in intact liposomes corresponds to a ratio of 0. Cholesterol was added into liposomes containing 4 mol% mTHPC. Investigations on PEGylation were performed with liposomes loaded with 8 mol% mTHPC.

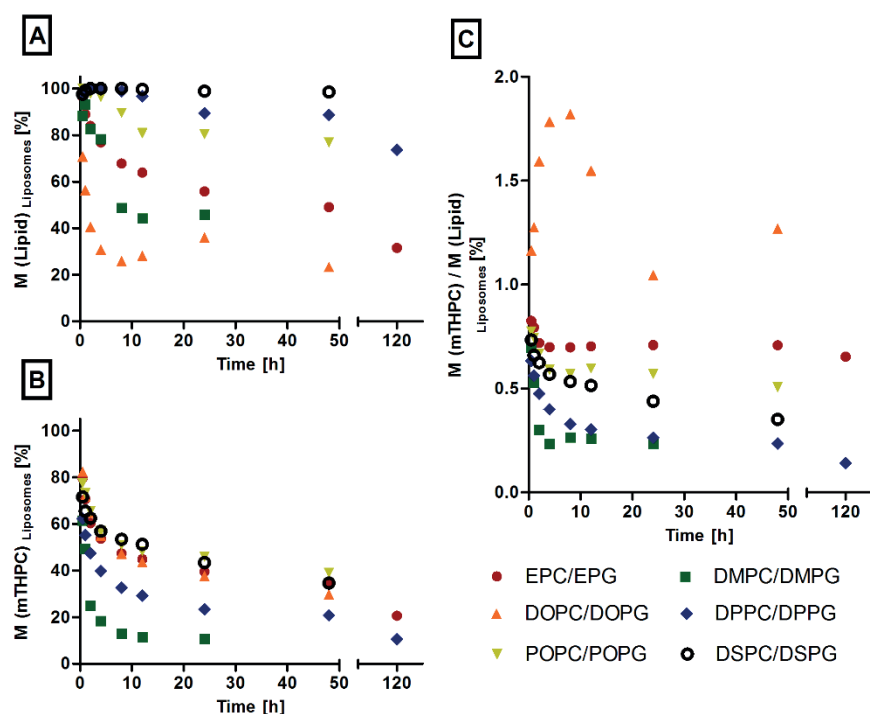


Figure 4: Effect of lipid composition on **(A)** liposome stability, **(B)** drug release in human plasma and **(C)** the corresponding DLR in the liposome fraction. The graphs indicate that the choice of lipid has an influence on vesicle integrity and drug retention in liposomes. All formulations were loaded with 8 mol% mTHPC.

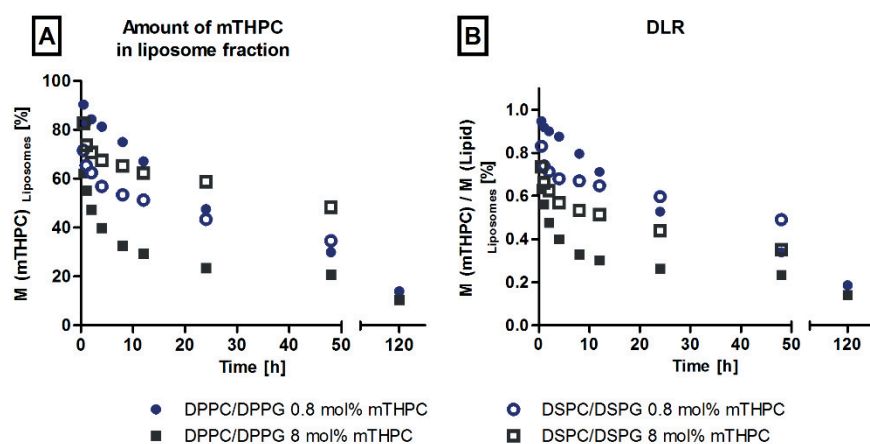


Figure 5: Comparison of drug retention in DPPC and DSPC liposomes for different drug loadings.

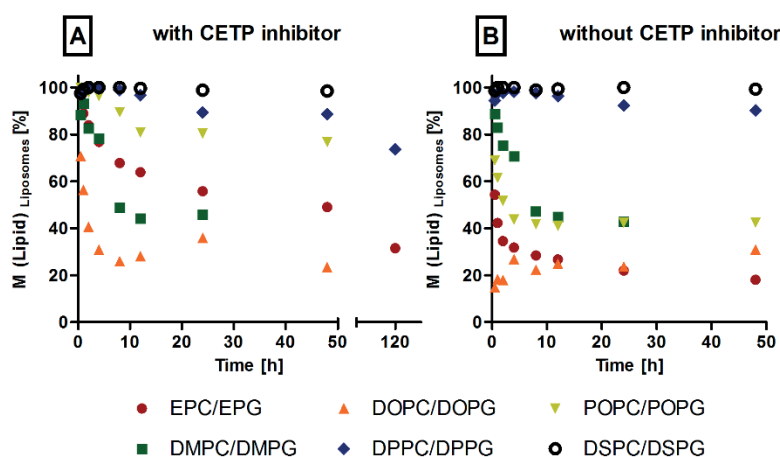


Figure 6: Apparent liposome stability of unmodified 8 mol% mTHPC containing liposomes with varying lipid compositions. **(A)** Plasma was pre-incubated with the CETP inhibitor torcetrapib 12 hours prior liposome addition. **(B)** To evaluate a potential additional ^3H -COE release from liposomal bilayers experiments were also performed with non-pre-incubated plasma.

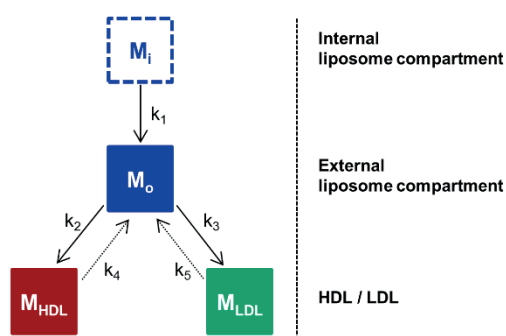


Figure 7: Reaction Scheme. Internal liposome compartment (M_i) sends mTHPC monomers to the external (M_o) one with constant rate k_1 . Then, drug molecules are transferred to HDL and LDL with rate constants k_2 and k_3 , respectively. We assume that HDL and LDL behave like sinks ($k_4 = k_5 = 0$). In one modified version of our model, we also include the presence of reactions back to the external compartments with corresponding rate constants k_4 and k_5 .

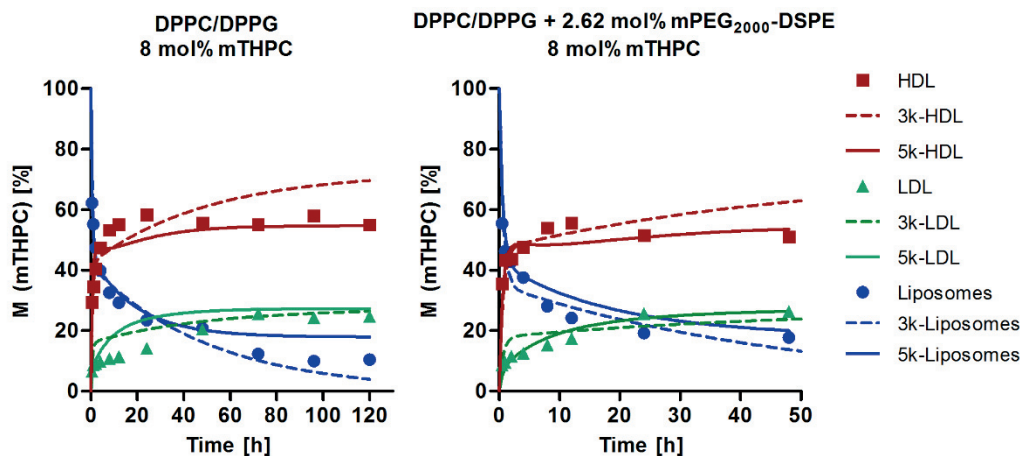


Figure 8: Exemplary fits for the 3k- and 5k-model for Foslip® (DPPC/DPPG + 8 mol% mTHPC) and Fospeg®. Data are displayed in Table II (3k-model) and SI (5k-model).

Supplementary Information

Table SI-I. Transfer constants k_{1-3} and k_{1-5} for various lipid compositions and the corresponding $M_i(0)$ and $M_o(0)$ for the investigated liposome formulations.

No.	Membrane composition	mTHPC [%]	3k-model		5k-model	
			M _i (0) [%]	M _o (0) [%]	M _i (0) [%]	M _o (0) [%]
EPC/EPG (9:1 (w/w), 20 mg/ml phospholipid)						
3k-model: k1= 0.0054 k2= 0.3693 k3= 0.1471						
5k-model: k1= 0.0206 k2= 0.3685 k3= 0.0833 k4= 0.1771 k5= 0.0833						
1	Unmodified	0.8	63.36	36.64	60.76	39.24
2	Unmodified	4	53.31	46.69	43.90	56.10
3	Unmodified	8	45.68	54.32	30.58	69.41
4	+ 7.5 mol% Cholesterol	4	52.36	47.64	43.33	56.67
5	+ 15 mol% Cholesterol	4	42.56	57.44	28.59	71.41
6	+ 22.5 mol% Cholesterol	4	41.51	58.49	23.43	76.57
7	+ 30 mol% Cholesterol	0.8	38.41	61.59	22.51	77.49
8	+ 30 mol% Cholesterol	4	29.17	70.83	6.95	93.04
9	+ 2.62 mol% PEG ₇₅₀ -DSPE	8	50.46	49.54	39.04	60.96
10	+ 2.62 mol% PEG ₂₀₀₀ -DSPE	8	54.59	45.41	44.94	55.06
DPPC/DPPG (9:1 (w/w), 20 mg/ml phospholipid)						
3k-model: k1= 0.0196 k2= 1.1346 k3= 0.4303						
5k-model: k1= 0.0493 k2= 1.1829 k3= 0.1890 k4= 0.3837 k5= 0.1234						
11	Unmodified	0.2	98.88	1.12	100.00	0.00
12	Unmodified	0.8	84.13	15.87	86.34	13.66
13	Unmodified	2	73.80	26.20	78.58	21.42
14	Unmodified	4	67.77	32.23	70.48	29.52
15	Unmodified	8	41.10	58.90	29.95	70.05
16	Unmodified	12	37.63	62.37	26.97	73.03
17	+ 7.5 mol% Cholesterol	4	49.48	50.52	44.39	55.61
18	+ 15 mol% Cholesterol	4	34.52	65.48	24.20	75.80
19	+ 22.5 mol% Cholesterol	4	29.95	70.05	14.21	85.79
20	+ 30 mol% Cholesterol	0.8	20.02	79.98	0.00	100.00
21	+ 30 mol% Cholesterol	4	7.93	92.07	0.00	100.00
22	+ 2.62 mol% PEG ₇₅₀ -DSPE	8	39.82	60.18	28.52	71.48
23	+ 2.62 mol% PEG ₂₀₀₀ -DSPE	8	34.68	65.33	27.07	72.93
DMPC/DMPG (9:1 (w/w), 20 mg/ml phospholipid)						
3k-model: k1= 0.0179 k2= 0.7557 k3= 0.2761						
5k-model: k1= 0.6884 k2= 1.9028 k3= 0.9141 k4= 0.3916 k5= 0.5566						
24	Unmodified	8	17.29	82.71	58.42	41.58

DOPC/DOPG (9:1 (w/w), 20 mg/ml phospholipid), with CETP-inhibition3k-model: $k_1 = 0.0110$ $k_2 = 0.6537$ $k_3 = 0.1510$ 5k-model: $k_1 = 0.0361$ $k_2 = 0.6366$ $k_3 = 0.0505$ $k_4 = 0.2609$ $k_5 = 0.0505$

25	Unmodified	8	52.02	47.98	42.22	57.78
----	------------	---	-------	-------	-------	-------

DOPC/DOPG (9:1 (w/w), 20 mg/ml phospholipid), without CETP-inhibition3k-model: $k_1 = 0.0096$ $k_2 = 0.5622$ $k_3 = 0.1318$ 5k-model: $k_1 = 0.0319$ $k_2 = 0.5181$ $k_3 = 0.0510$ $k_4 = 0.2072$ $k_5 = 0.0510$

25	Unmodified	8	49.19	50.81	37.81	62.19
----	------------	---	-------	-------	-------	-------

DSPC/DSPG (9:1 (w/w), 20 mg/ml phospholipid), without inhibitor3k-model: $k_1 = 0.0088$ $k_2 = 1.7052$ $k_3 = 0.3484$ 5k-model: $k_1 = 0.0108$ $k_2 = 1.6617$ $k_3 = 0.2328$ $k_4 = 0.1692$ $k_5 = 0.0918$

26	Unmodified	0.8	72.29	27.71	70.53	29.47
----	------------	-----	-------	-------	-------	-------

27	Unmodified	8	57.56	42.44	54.45	45.55
----	------------	---	-------	-------	-------	-------

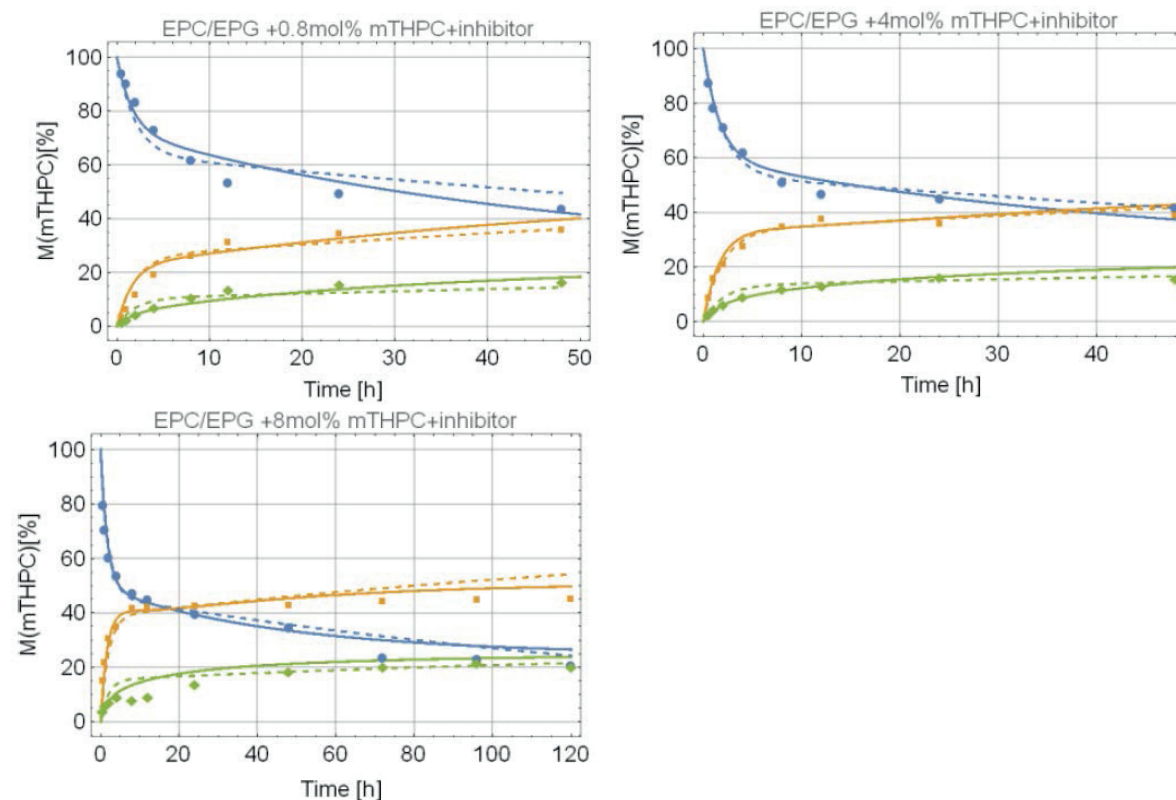
POPC/POPG (9:1 (w/w), 20 mg/ml phospholipid)3k-model: $k_1 = 0.0071$ $k_2 = 0.8685$ $k_3 = 0.1469$ 5k-model: $k_1 = 0.0095$ $k_2 = 0.8447$ $k_3 = 0.0940$ $k_4 = 0.0878$ $k_5 = 0.0362$

28	Unmodified	8	56.43	43.57	53.54	46.46
----	------------	---	-------	-------	-------	-------

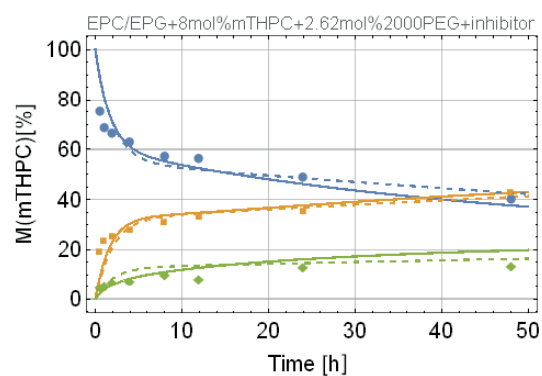
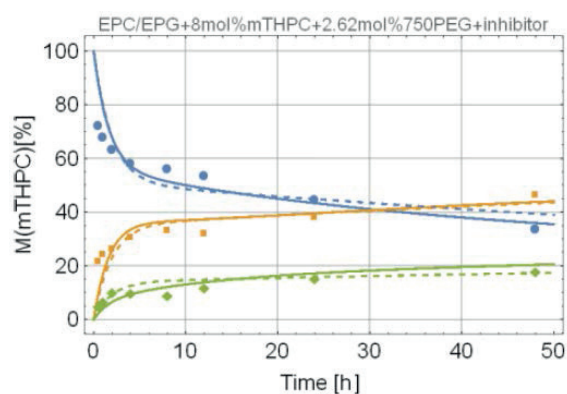
Compilation of data sets and resulting fits for the 3k- (dashed lines) and 5k-model (solid lines)

(A) EPC/EPG

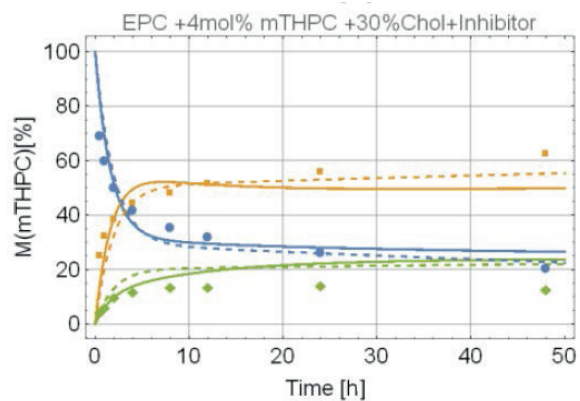
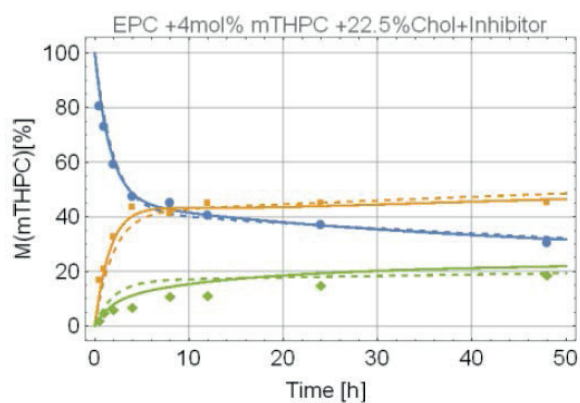
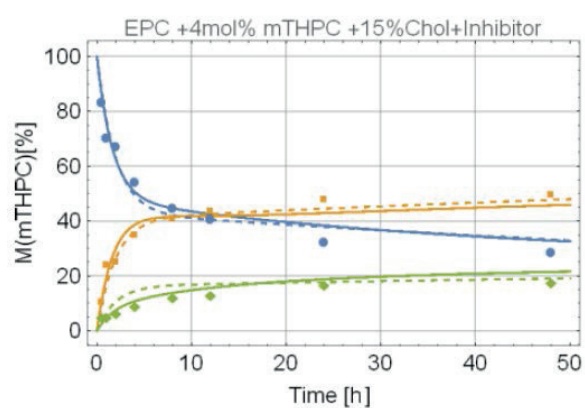
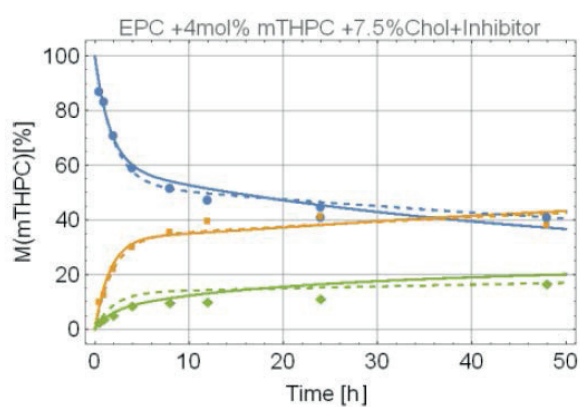
(1) Drug Loading



(2) PEGylation

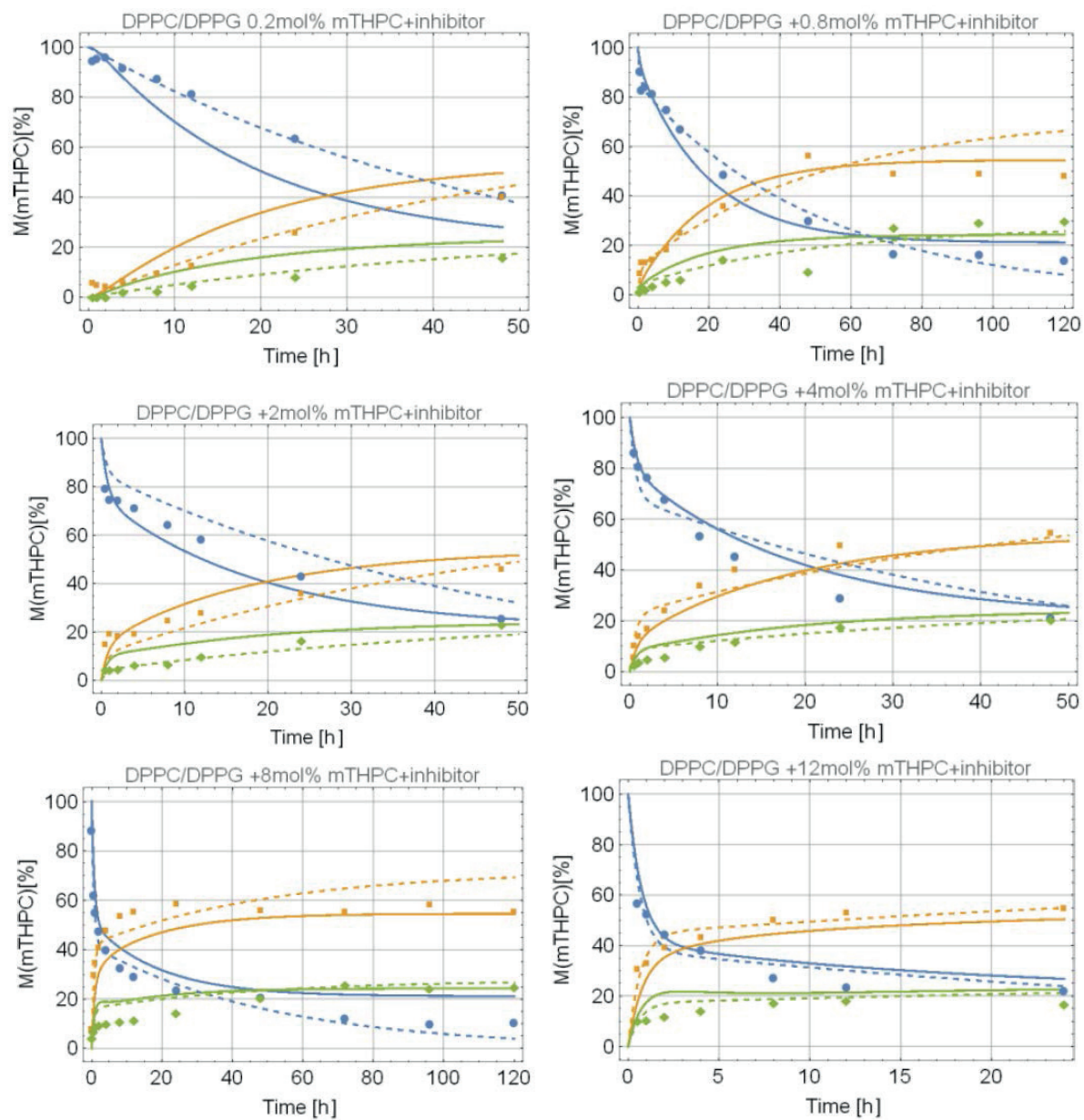


(3) Employment of Cholesterol

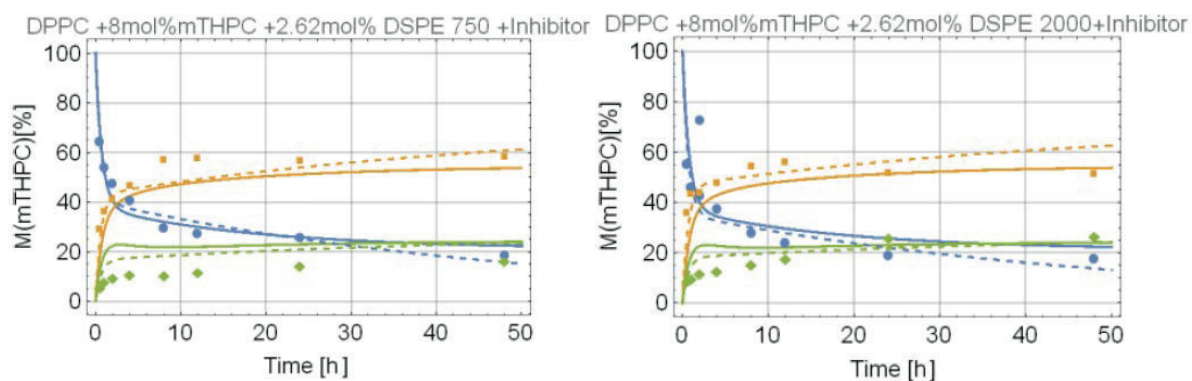


(B) DPPC/DPPG

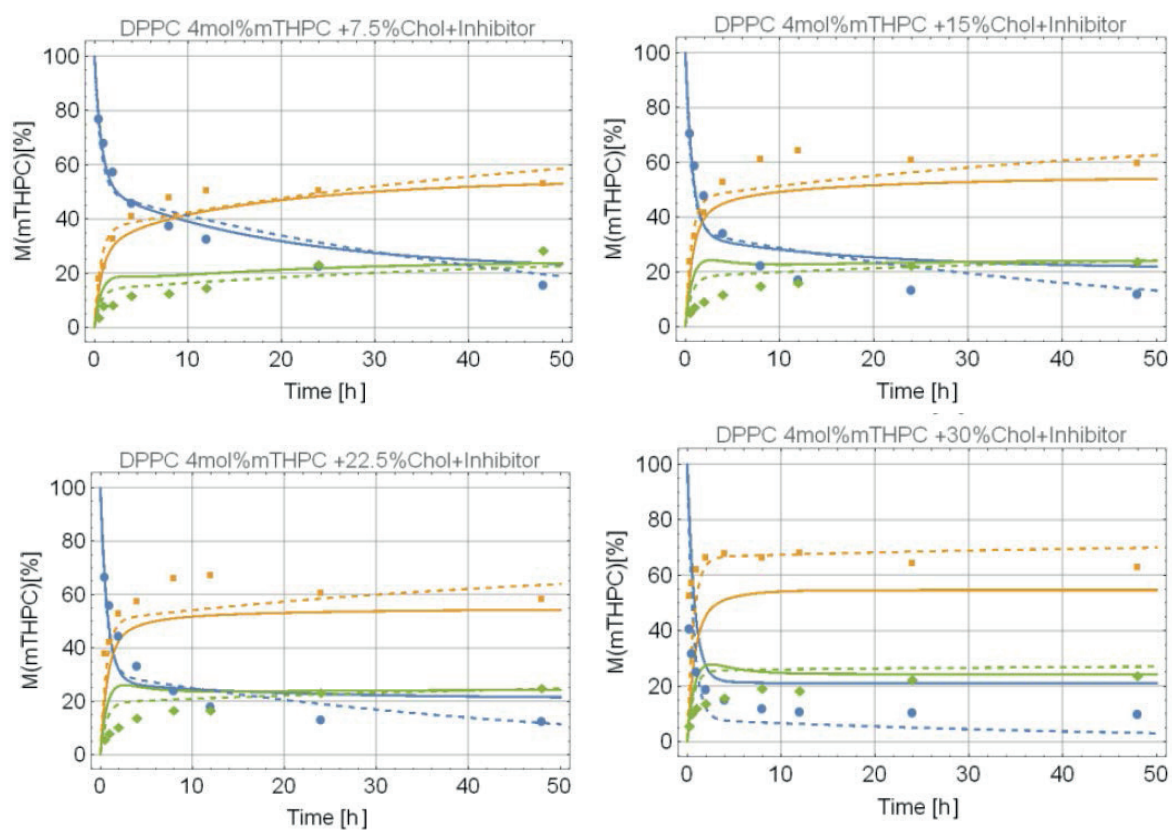
(1) Drug Loading



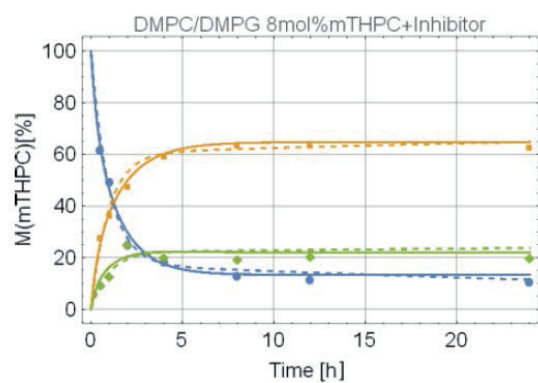
(2) PEGylation



(3) Employment of Cholesterol

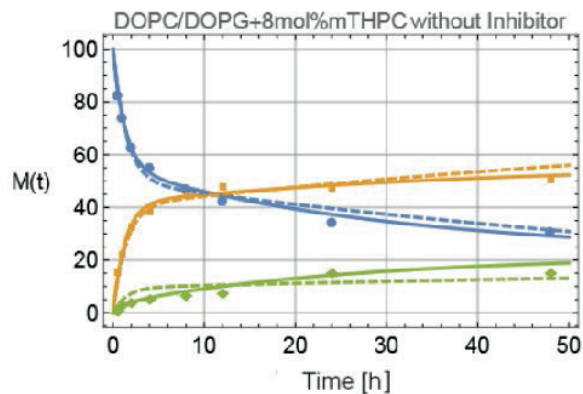
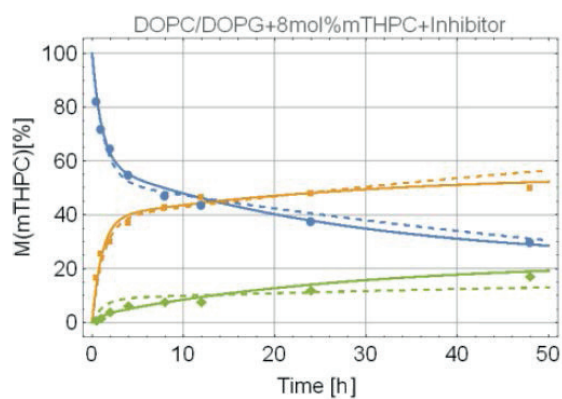


(C) DMPC/DMPG



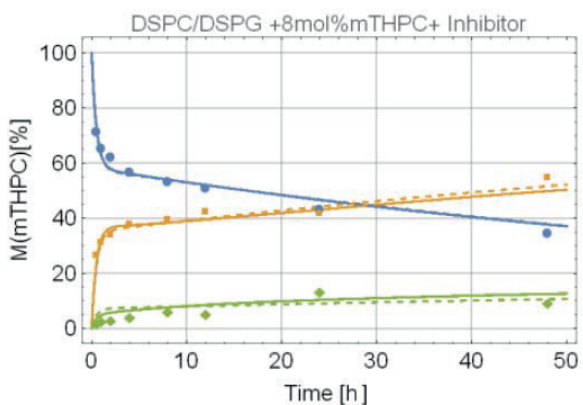
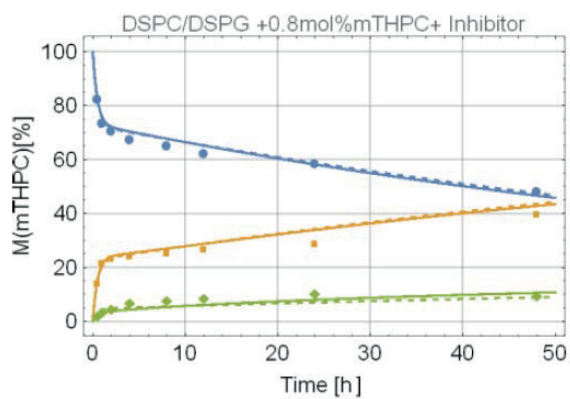
(D) DOPC/DOPG

(1) Effect of Torcetrapib / CETP-inhibition

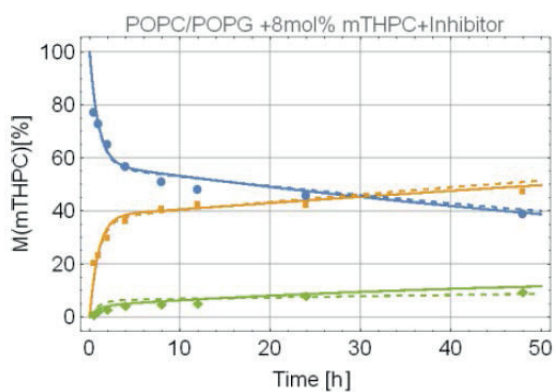


(E) DSPC/DSPG

(1) Effect of Drug Loading



(F) POPC/POPG



3 Unveröffentlichte Daten

3.1 Motivation

Anhand der zuvor vorgestellten Publikationen konnte gezeigt werden, dass es mithilfe der AF4 möglich ist, das Verhalten von mTHPC-Liposomen in humanem Plasma zu untersuchen. Ebenso konnten in Zusammenarbeit mit Dr. Daniel Molnar anhand derselben Methode die Stabilität von SPC/Cholesterol-Liposomen in diesem Medium und der Austausch verschiedener in den Bilayer eingebauter PEG-Cholesterolanker an Plasmakomponenten untersucht werden (Molnar 2015). Im weiteren Verlauf der Arbeit galt es nun, das Verhalten alternativer Modellsubstanzen in Gegenwart von humanem Plasma zu untersuchen. Durch Variation der Lipophilie der untersuchten Substanzen über einen log P-Bereich von 3 bis 9 sollten die vorab für mTHPC getätigten Beobachtungen in einem größeren Gesamtkontext beurteilt werden.

Weiterhin wurde mithilfe der Langmuir-Filmwaage eine zusätzliche Methode angewandt, die zum einen Aufschlüsse über mögliche Wechselwirkungen zwischen mTHPC und entsprechenden Phospholipiden geben sollte und zum anderen eine weitere Möglichkeit darstellte, das Transferverhalten von lipophilen Arzneistoffen aus dem liposomalen Bilayer an eine andere Modellmembran – hier den auf die Subphase gespreiteten Monolayer – zu charakterisieren.

3.2 Materialien und Methoden

3.2.1 Chemikalien

Acetonitril.....	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Cholesterol	Genzyme, Liestal, Schweiz
Chloroform.....	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Curcumin C3 Complex	Sabinsa, Langen, Deutschland
Curcumin (³ H-gelabelt).....	Biotrend Chemicals, Köln, Deutschland
DPPC	Genzyme, Liestal, Schweiz
DPPG	Genzyme, Liestal, Schweiz
EPC	Lipoid GmbH, Ludwigshafen, Deutschland
EPG.....	Lipoid GmbH, Ludwigshafen, Deutschland
Essigsäure.....	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Estradiol-Hemihydrat.....	Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA
Estradiol (¹⁴ C-gelabelt).....	Biotrend Chemicals, Köln, Deutschland
Ethanol (≥ 99 % Reinheit)	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
α-D-Glukose	Roquette GmbH, Frankfurt, Deutschland

Methanol (> 99 % Reinheit).....	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
mTHPC.....	biolitec Research GmbH, Jena, Deutschland
mTHPC (¹⁴ C-gelabelt)	biolitec Research GmbH, Jena, Deutschland
Natriumazid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid (≥ 99 %).....	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Nelfinavir	Bombay College of Pharmacy, Mumbai, Indien
Nelfinavir (³ H-gelabelt)	Biotrend Chemicals, Köln, Deutschland
POPC	Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL, USA
POPG	Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL, USA
Propofol (CRS).....	Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA
Propofol (³ H-gelabelt).....	Biotrend Chemicals, Köln, Deutschland
RotiSzint® eco plus	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Salzsäure	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Torcetrapib	Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA
TRIS	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Wasser, reinst	Merck Milipore, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

3.2.2 Herstellung der Liposomen

Die verwendeten Liposomen wurden analog den Veröffentlichungen 2 und 3 durch Filmbildung und Extrusion hergestellt (Holzschuh et al. 2015). Ihre Zusammensetzungen sind Tabelle 4 bzw. Tabelle 6 zu entnehmen. Die Lipide und APIs wurden in den geeigneten organischen Lösungsmitteln (Chloroform, Ethanol oder Methanol) gelöst. Im Falle der Herstellung von radioaktiv markierten Liposomen wurde ein Aliquot der entsprechenden Stammlösung des markierten Lipids bzw. APIs hinzugefügt. Anschließend wurde mithilfe eines Rotationsverdampfers (Rota Vapor R-114 und Vacobox B-177, Büchi Labortechnik GmbH, Essen, Deutschland) durch Verdampfen der Lösungsmittel ein homogener Lipidfilm gebildet, welcher anschließend für mindestens zwei Stunden unter Vakuum (< 50 mbar) getrocknet wurde. Die Rehydratisierung erfolgte entweder im Falle der AF4-Versuche mit 5 %iger (m/V) Glukoselösung (filtriert durch einen 0,2 µm Sterilfilter (VWR, Darmstadt, Deutschland)) oder für die Versuche am Langmuir-Trog mit Reinstwasser. Die Dispersion wurde mit einem Handextruder (LiposoFast Basic, Avestin Inc., Ottawa, Kanada) 41-mal durch eine Polycarbonatmembran mit einer definierten Porengröße von 100 nm (Armatis, Mannheim, Deutschland) extrudiert.

3.2.3 Gehaltsbestimmung

Für die Gehaltsbestimmung wurden 200 µl der Liposomen mit 4 ml 0,9 % (m/V) NaCl verdünnt und mittels Ultrazentrifugation (Beckman XL80, SW 55 Ti Rotor, Beckman Coulter, Brea, CA, USA) bei 4 °C und 200.000 xg für 3 h zentrifugiert. Der Überstand wurde entnommen und das Pellet oder eine entsprechende Menge der Liposomen in 1 ml Methanol redispergiert. Aliquote

des Überstandes sowie der aufgereinigten als auch nicht aufgereinigten Liposomen wurden anschließend auf ihren API-Gehalt untersucht.

Für die radioaktiv markierten Liposomen geschah dies mithilfe von Flüssigszintillationszählung (Vgl. 3.2.4), indem ein Anteil der entsprechenden Proben mit 3 ml Szintillationscocktail (RotiSzint® eco plus) für 30 s homogenisiert und die enthaltene Radioaktivität bestimmt wurde, die die Berechnung des API-Gehalts ermöglichte (Vergleiche 3.2.4).

Im Fall der nichtmarkierten Liposomen erfolgte die Gehaltsbestimmung mittels HPLC an einem GOLD-System (Beckman Coulter, Brea, CA, USA), welches mit einem DAD (SYSTEM GOLD UV/Vis 168) verbunden war. Für die Auftrennung wurde eine Synergi Max-RP18-Säule (4 Microns, 80 Å, Phenomenex, Torrance, CA, USA) verwendet. 500 µl des Überstandes, 100 µl der redispergierten und 10 µl der nicht aufgereinigten Liposomen wurden in je einem HPLC-Vial (1,5 ml, VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland) mit Methanol auf 1 ml verdünnt. 20 µl der jeweiligen Lösungen wurden mithilfe eines Autosamplers injiziert. Die Auftrennung erfolgte nach einem Gradienten, der aus 0,5 % Essigsäure (Phase A) und Acetonitril (Phase B) bestand. Genauere Informationen hierzu befinden sich in Tabelle 2.

Alle Formulierungen wurden im Anschluss bei 4 °C im Kühlschrank gelagert.

Tabelle 2: Bestimmung der Einschlusseffizienz (EE) mittels HPLC. (I) Methode und (II) die entsprechenden Detektionswellenlängen.

I			II	
Stufe	Dauer (min)	Gradient	API	λ (nm)
1	3	Konstant bei 10 % B	Cholesterol	273
2	17	Linear steigend auf 90 % B	Curcumin	412
3	5	Konstant bei 90 % B	Estradiol	278
4	2	Linear fallend auf 10 % B	mTHPC	412
5	5	Konstant bei 10 % B	Nelfinavir	254
			Propofol	271

3.2.4 Flüssigszintillationszählung

Die Messung des radioaktiven Inhalts erfolgte anhand von LSC-Messungen an einem Tricarb 2800 TR LSC (Perkin Elmer, Rodgau, Deutschland). Ein Aliquot der entsprechenden Proben wurde in einem Szintillationsvial (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) mit mindestens 2 Teilen Szintillationscocktail (Rotiszint® eco plus, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) für mindestens 30 Sekunden homogenisiert. Die Bestimmung der Mengen an ^3H - und ^{14}C -Aktivität erfolgte simultan und wurde als entsprechende dpm-Werte ausgegeben. Weitere Details sind den Veröffentlichungen 2 und 3 zu entnehmen.

3.2.5 Photonenkorrelationsspektroskopie

Die Bestimmung der Partikelgröße und Partikelgrößenverteilung erfolgte direkt nach der Herstellung der Liposomen und in definierten zeitlichen Abständen (1 bis 2 Wochen). Die Messungen wurden an einem Zetasizer Nano ZS (Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments, Herrenberg, Deutschland) durchgeführt. 10 µl Liposomen wurden in 990 µl des entsprechenden Dispersionsmittels (filtriert durch einen 0,2 µm Sterilfilter) in einer Küvette verdünnt. Die Probe wurde in 4 Durchläufen mit jeweils 12 bis 16 Messungen im Rückstreumodus (173°) gemessen. Die Temperatur wurde auf 25 °C eingestellt und die entsprechende Viskosität wurde zur Berechnung im System hinterlegt.

3.2.6 Weiterführende Untersuchungen an der AF4

Die Stabilitäts- und Transferuntersuchungen wurden analog zu jenen Studien durchgeführt, die in den Veröffentlichungen 2 und 3 für mTHPC detailliert beschrieben wurden.

Die Auftrennung erfolgte an einem AF2000 MT-System, das an einen RI-, MALLS-, UV/Vis- (Postnova Analytics, Landsberg, Deutschland) und DLS-Detektor (Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments, Herrenberg, Deutschland) gekoppelt war. Der trapezförmige Kanal hatte eine Fläche von 31,6 cm² und eine Höhe von 500 µm. Es wurde eine Membran aus regenerierter Cellulose mit einem Größenausschluss von 10 kDa verwendet. Die Elution erfolgte bei einem Detektorfluss von 1 ml/min über 90 Minuten. Die einzelnen Teilschritte können Tabelle 3 entnommen werden.

Tabelle 3: Auftrennung des Plasma-Liposomen-Gemisches mittels AF4.

Stufe	Dauer (min)	Verlauf	Cross-Flow [ml/min]
1	12	Injektion + Fokussierung (Injektionsfluss = 0,2 ml/min, Fokusfluss = 4,8 ml/min)	4,0
2	1	Übergang von Fokus- auf Detektorfluss	
3	18	Cross-Flow konstant	4,0
4	30	Cross-Flow exponentiell abnehmend (Exponent: 0,3)	4,0 auf 0,4
5	10	Cross-Flow exponentiell abnehmend (Exponent: 0,3)	0,4 auf 0,01
6	15	Cross-Flow konstant	0,01
7	4	Cross-Flow konstant	0

In allen Versuchen wurde Plasma eines männlichen Spenders verwendet. Dieses wurde aufgetaut und durch einen 0,2 µm Sterilfilter (Rotilabo® Mini-Tip, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) filtriert. Ein Aliquot an Liposomen, das einem Lipidgehalt von 1,5 µmol entsprach, wurde mit 500 µl dieses Filtrates gemischt und mit einem Puffer (150 mM NaCl, 0,03 % NaN₃ und 10 mM Tris), der gleichzeitig als Fließmittel diente, auf 1 ml verdünnt. Ein Volumen von 20,31 µl dieser Mischung wurde manuell injiziert.

Um die Eignung der Methode für die gewählten Substanzen zu untersuchen, wurden alle Formulierungen zunächst für zwei Stunden in einem Wasserbad bei 37 °C in humanem Plasma inkubiert, bevor sie anschließend aufgetrennt und die entsprechenden Fraktionen aufgearbeitet wurden. Allen Liposomen-Plasma-Gemischen wurde der Cholesterolester-Transferprotein (CETP)-Inhibitor Torcetrapib in DMSO zugefügt, sofern ^3H -COE (Cholesteryloleylether) als Lipidlabel in die jeweilige Membran eingebaut wurde. Für die rigide Curcumin-Formulierung (Formulierung 1, Tabelle 4) wurden zusätzlich Inkubationszeiten von 1, 4, 8 und 12 Stunden untersucht.

Der Cross-Flow sowie der Detektorfluss wurden in einem Sammelgefäß aufgefangen. Die Wiederfindung wurde aus der Summe der Aktivität in den einzelnen Fraktionen berechnet. Zusätzlich wurde der radioaktive Inhalt des Sammelgefäßes bestimmt.

3.2.7 Durchführung der Untersuchungen an der Filmwaage

Die Versuche wurden an einem Langmuir-Trog RK1-System der Firma Riegler & Kirstein GmbH (Potsdam, Deutschland) durchgeführt. Der sogenannte „Biotrog“ aus Teflon besaß eine Fläche von 60 cm², wurde in eine vor Staub und Licht schützende Staubbox eingehaust und auf einem aktiv gedämpften Tisch gelagert. Eine zentrierte Vertiefung mit einem Durchmesser und einer Tiefe von 2 cm ermöglichte das Eintauchen eines Filterpapiers, dass zur Bestimmung der Oberflächenspannung nach der Wilhelmy-Methode verwendet wurde. Die Temperierung erfolgte über ein Wasserbad mit Thermostat (Julabo GmbH, Seelbach, Deutschland). Die Bewegung der Barrieren und Messungen der Oberfläche, Oberflächenspannung und Temperatur erfolgten elektronisch über eine Steuereinheit. Durch Bewegung der Barrieren wurde die Fläche mit einer Geschwindigkeit von 0,041 cm²/s (entspricht 50 Skaleneinheiten in der Steuereinheit) komprimiert oder expandiert. Die Daten wurden zur weiteren Auswertung mit der dazugehörigen Software aufgezeichnet.

Als Subphase wurden 32 ml Reinstwasser verwendet. Magnetrührer, die mit einer Geschwindigkeit von 100 rpm gedreht wurden, sorgten für eine stetige Homogenisierung. Die Versuche wurden – sofern nicht anders angegeben – bei 25°C durchgeführt. Die Kalibrierung des Wilhelmy-Messsystems erfolgte in regelmäßigen Abständen mit Arachidinsäure. Arachidinsäure besitzt einen deutlichen Phasenübergang bei 25,6 mN/m (Kjaer et al. 1989, Modlinska und Bauman 2011). Vor jedem Versuch wurde zusätzlich die Kalibrierung mit Reinstwasser ($\gamma = 72 \text{ mN/m}$ bei 25 °C (Vargaftik et al. 1983)) kontrolliert.

Zwischen den Versuchen wurde der Trog mit Methanol gereinigt. Anschließend erfolgte eine mehrfache Spülung mit Reinstwasser. Die Reinheit des Troges wurde angenommen, wenn eine maximale Kompression der Barrieren eine Veränderung des Lateraldrucks von $\leq 0,2 \text{ mN/m}$ ergab.

In einem ersten Ansatz wurden π -A-Diagramme – sogenannte Isothermen – für reine Lipid- bzw. mTHPC-Lösungen aufgenommen, bevor entsprechende Mischungen mit einem Phospholipid / mTHPC Verhältnis zwischen 1:0 und 0:1 untersucht wurden. Es wurden Stammlösungen von DPPC ($c = 4,3104 \cdot 10^{-7}$ mol/ml), mTHPC ($c = 1,0283 \cdot 10^{-7}$ mol/ml) und POPC ($c = 1,4959 \cdot 10^{-7}$ mol/ml) in Chloroform hergestellt. Aliquote dieser Lösungen wurden gemischt und mit einer Mikroliterspritze (Hamilton®, Reno, NV, USA) auf die Subphase gespreitet. Nach Verdampfen des Chloroforms wurden die Barrieren mit einer konstanten Geschwindigkeit komprimiert, bis ein Kollaps des Films beobachtet werden konnte. Die Berechnung des Flächenbedarfs pro Molekül für $\pi = 0$ mN/m erfolgte durch Extrapolation des linearen Teils der Isotherme.

In einem weiteren Versuchsaufbau wurden Aliquote der POPC-Stammlösung auf die Subphase gespreitet. Der gebildete Film wurde – sofern nicht anders angegeben – auf einen bestimmten Lateraldruck π (5 – 30 mN/m) komprimiert. Die Gesamtfläche des Films betrug 20 bis 25 cm². Durch automatisierte Bewegung der Barrieren über einen Feedbackmechanismus wurde der Druck im Folgenden konstant gehalten. Sobald für 15 Minuten keine weitere Flächenänderung (ΔA) beobachtet werden konnte, wurden entsprechende Mengen an Liposomen mit einer gebogenen Mikroliterspritze unterhalb der Barriere der Subphase zugefügt und der Flächenzuwachs des Monolayers über die Zeit gemessen. Die Messung wurde abgebrochen, wenn keine weitere Flächenzunahme beobachtet werden konnte oder der Film kollabierte, frühestens jedoch nach 60 Minuten. Die resultierenden Kurven (ΔA -t-Diagramme) wurden mit einer exponentiellen Funktion extrapoliert und die relevanten Parameter (ΔA , $t_{0,5}$) zusammengefasst. Es wurde die Abhängigkeit des relativen Flächenwachstums und der Geschwindigkeitskonstante vom angelegten Lateraldruck sowie der Zusammensetzung und Menge der hinzugegebenen Liposomen untersucht.

Alle Extrapolationen wurden mit GraphPad Prism (Version 5.01, GraphPad Inc., La Jolla, CA, USA) durchgeführt.

3.3 Ergebnisse und Diskussion der weitergehenden Untersuchungen des Verhaltens lipophiler liposomaler APIs in humanem Plasma

3.3.1 Charakterisierung der Formulierungen

Tabelle 4 fasst verschiedene physikochemische Parameter der zusätzlich zu den in den Veröffentlichungen untersuchten Liposomen zusammen.

Tabelle 4: Zusammensetzung, Partikelgröße und Partikelgrößenverteilung (PDI) der untersuchten Formulierungen sowie die Einschlusseffizienz (EE) der jeweiligen Arzneistoffe in den Bilayer und die Wiederfindungen (WF) nach Auftrennung mithilfe der AF4. Die Formulierungen wurden in 5 %iger (m/V) Glukoselösung hergestellt.

Nr.	Formulierung	log P_{API}^1	z-Average [d. nm] / PDI	EE [%]	WF API [%] ¹	WF Lipid [%] ^{1,2}
1	DPPC/DPPG (9:1 (m/m), 20 mg/ml) Curcumin (8 mol%) 2 μ Ci/ml ³ H-Curcumin 2 μ Ci/ml ¹⁴ C-DPPC	3,29 ²	124 \pm 5 0,09 \pm 0,02	100 \pm 1	16 / 62	101 / 104
2	EPC/EPG (9:1 (m/m), 20 mg/ml) Curcumin (8 mol%) 2 μ Ci/ml ³ H-Curcumin 2 μ Ci/ml ¹⁴ C-DPPC	3,29 ²	103 \pm 3 0,09 \pm 0,03	99 \pm 1	14 / 68	93 / 98
3	EPC/EPG (9:1 (m/m), 20 mg/ml) Estradiol (8 mol%) 4 μ Ci/ml ³ H-COE 2 μ Ci/ml ¹⁴ C-Estradiol	4,01 ²	100 \pm 2 0,12 \pm 0,03	77 \pm 3	10 / 105	100 / 104
4	DPPC/DPPG (9:1 (m/m), 20 mg/ml) Nelfinavir (8 mol%) 4 μ Ci/ml ³ H-Nelfinavir 2 μ Ci/ml ¹⁴ C-DPPC	5,7* ² 4,07 ³	107 \pm 1 0,12 \pm 0,02	80 \pm 3	17 / 97	90 / 96
5	EPC/EPG (9:1 (m/m), 20 mg/ml) Nelfinavir (8 mol%) 4 μ Ci/ml ³ H-Nelfinavir 2 μ Ci/ml ¹⁴ C-DPPC	5,7* ² 4,07 ³	102 \pm 2 0,07 \pm 0,02	87 \pm 1	9 / 91	91 / 99
6	EPC/EPG (9:1 (m/m), 20 mg/ml) Propofol (8 mol%) 2 μ Ci/ml ³ H-Propofol 2 μ Ci/ml ¹⁴ C-DPPC	3,79 ²	112 \pm 1 0,11 \pm 0,01	85 \pm 3	7 / 92	104 / 107

¹ Wiederfindung in den Fraktionen / Wiederfindung inklusive Sammelgefäß für 2 h Inkubation

² aus „Pubchem“ (NCBI 2004-2016)

aus „Viracept (Product Monograph)“ (Pfizer Canada Inc. 2012)

³ Berechnet mit XLogP3

Alle Formulierungen besaßen eine Partikelgröße von ca. 100 nm und einen PDI kleiner als 0,1, was auf eine homogene Größenverteilung hindeutet. Estradiol, Nelfinavir und Propofol zeigten Einschlusseffizienzen in den Bilayer im Bereich von 75 bis 85 %. Propofol wird klinisch in der phospholipidhaltigen Emulsion Diprivan® (AstraZeneca, London, Großbritannien) angewandt. In einer Reihe von Arbeiten konnte zusätzlich gezeigt werden, dass sich der Wirkstoff mit herkömmlichen Methoden der Liposomenherstellung (z.B. Ultraschallbehandlung) bis zu 20 mol% in die Membran einbauen lässt. Durch Herstellung mittels eines Microfluidizers konnte dieser Wert sogar auf ca. 50 mol% erhöht werden (Kastner et al. 2015). Die durch Ultraschallbehandlung hergestellten Vesikel waren jedoch bei Lagerung nicht in der Lage, den Wirkstoff in der Membran zu halten, was im Rahmen dieser Arbeit nicht beobachtet werden konnte. Für Estradiol wurde berichtet, dass der Einbau des Wirkstoffes in liposomale Membranen von deren Fluidität abhängt. Die Autoren konnten je nach Beladung eine Einschlusseffizienz zwischen 18,6 (10 mol% Estradiol) und 56 % (1 mol%) für eine EPC-Formulierung erzielen, wohingegen für die entsprechenden rigiden DPPC-Formulierungen 8,2 bzw. 63,4 % in der Membran gehalten werden konnten (Bowey et al. 2014). Die im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ergebnisse liegen deutlich oberhalb der Literaturwerte. Eine Möglichkeit hierfür könnte sein, dass die Gehaltsbestimmung mithilfe von Ultrazentrifugation bestimmt wurde, wohingegen Bowey et al. Tangentiale Flow-Filtration nutzten. Diese Methode, die der AF4 im Aufbau ähnelt, filtriert den nicht eingebauten Wirkstoff unter Sink-Bedingungen und einer permanenten Verdünnung, was zu einer zusätzlichen Wirkstofffreisetzung führen kann (Vergleiche 3.3.2). mTHPC sowie das hydrophilere Curcumin ließen sich komplett in die Liposomenmembran einarbeiten. Liposomales Curcumin ist ein in der Literatur intensiv betrachtetes Thema. Der Wirkstoff ist aufgrund seiner zahlreichen pharmakologischen Eigenschaften (antiinflammatorisch, antimikrobiell sowie antikanzerogen) für eine Reihe von Therapien interessant. Gleichzeitig leidet er unter schlechter oraler Bioverfügbarkeit aufgrund seiner geringen Löslichkeit in wässrigen Medien. Dagegen lässt er sich sehr gut in Phospholipidmembranen einbauen (Hasan et al. 2014). Chen et al. konnten eine Einschlusseffizienz von ca. 80% in einer 4 mol%-Formulierung ermitteln (Chen et al. 2012). Sie verwendeten hierfür SEC in Form einer Spin Column. Wir haben in unseren Versuchen festgestellt, dass Curcumin sehr schnell an Membranen und auch das Säulenmaterial bindet, was zu einer Freisetzung des Wirkstoffes führen kann.

3.3.2 Transferuntersuchungen in humanem Plasma

Die Formulierungen wurden für zwei Stunden mit humanem Plasma inkubiert und die Proben anschließend mithilfe der AF4 aufgetrennt. Dabei zeigten die Elutionsprofile eine sehr gute Auftrennung der relevanten Plasmafraktionen und Liposomen, analog zu jenen, die in Veröffentlichung 2 dargestellt sind.

Der Lipidlabel konnte in jedem Versuch zu > 90 % in den Fraktionen wiedergefunden werden. Die Formulierungen zeigten dabei eine beladungsunabhängige Stabilität von 81 ± 2 % für die EPC/EPG-Formulierungen und > 90 % für die DPPC/DPPG-Formulierungen. Diese Ergebnisse korrelieren sehr gut mit den Werten, die für die entsprechenden unbeladenen Liposomen und jenen mit unterschiedlichem mTHPC-Gehalt bestimmt wurden (Veröffentlichung 2 und 3).

Anders verhielt es sich mit der Wiederfindung der untersuchten APIs. Diese wurden zu großen Teilen aufgrund des angelegten Cross-Flows durch die Membran an der Rückseite des Kanals ausgespült und im entsprechenden Sammelgefäß wiedergefunden. Lediglich 7 bis 17 % der eingesetzten Radioaktivität konnte in den Fraktionen nach zwei Stunden Inkubationszeit nachgewiesen werden (Vergleiche Tabelle 4). Kuntsche et al. beobachteten dieses Phänomen bereits in einem ähnlichen Ausmaß bei der Auftrennung von Liposomen, die mit Testosteron ($\log P = 3,3$; Wiederfindung = 11 ± 1 %) und Hydrocortison ($\log P = 1,9$; Wiederfindung = $2,0 \pm 0,2$ %) beladen wurden und begründeten dies mit einer Wirkstofffreisetzung aufgrund der hohen Probenverdünnung. Sie konnten den Effekt in einem deutlich geringeren Ausmaß (ca. 20 % Wirkstofffreisetzung) auch für mTHPC nachweisen (Kuntsche et al. 2012). Unsere Studien in humanem Plasma zeigten ebenfalls, dass nur durchschnittlich 83 % des Temoporfin in den Fraktionen wiedergefunden werden konnte, der verbliebene Teil absorbierte an die Membran der AF4 oder wurde ausgespült (Veröffentlichung 2). Eine Freisetzung lipophiler APIs im wässrigen Medium mag auf den ersten Blick überraschen. Allerdings wurde unter den gewählten experimentellen Bedingungen die Liposomenformulierung ca. um den Faktor 200.000 verdünnt, was diese Hypothese – im Speziellen für Substanzen mit einem vergleichbar geringen $\log P$ -Wert von 3 bis 4 – unterstützen würde. Auch Decker et al. verweisen in ihren Untersuchungen mit mTHPC auf den starken Verdünnungs- und Spüleffekt (Decker et al. 2012).

Rückstände von Curcumin konnten zusätzlich an der Membran wiedergefunden werden, die eine deutliche Gelbfärbung aufzeigte. Dieses Absorptionsverhalten begründet die geringe Gesamtwiederfindung von 62 bzw. 68 %. Nicht ausgespültes und nicht absorbiertes Curcumin konnte nach 2 Stunden zu 70 % (entspricht ca. 10% des insgesamt zugefügten Curcumins) in den Albuminfraktionen wiedergefunden werden. Die Gesamtmenge der Radioaktivität nahm dabei mit der Inkubationszeit zu. So konnten nach 12 Stunden 24 % des eingesetzten

Curcumins wiedergefunden werden (16 % nach 2 Stunden), davon 84 % an Albumin gebunden. Auch die restlichen untersuchten Wirkstoffe konnten vor allem an Albumin wiedergefunden werden. Lediglich Spuren von Estradiol verblieben noch in den Liposomen (4 %).

Aufgrund der geringen Wiederfindung wurde auf eine weiterführende quantitative Auswertung des Transferverhaltens verzichtet. Unter den gewählten Bedingungen können daher keine abschließenden Aussagen über die Proteinbindung der untersuchten Modellschubstanzen getätigt werden. Diese müsste durch andere Verfahren – z.B. Größenausschlusschromatographie an einer kurzen Säule – bestimmt werden. Andererseits zeigen diese ersten Ergebnisse, dass die Substanzen unter „sink“-Bedingungen rasch freigesetzt werden können. Das ist besonders *in vivo* wichtig für den therapeutischen Effekt. Liposomale Formulierungen dieser Wirkstoffe eignen sich demnach vor allem zur Verbesserung der Löslichkeit. Nach Injektion ist es wahrscheinlich, dass sie schnell aus der Membran freigesetzt werden. Dies wiederum schränkt die Anwendung solcher Formulierungen für ein Targeting stark ein.

3.4 Ergebnisse und Diskussion der Untersuchungen an der Langmuir-Filmwaage

Neben Plasmaproteinen stellen Membranen *in vivo* einen zweiten potentiellen Akzeptor für lipophile Wirkstoffe dar. Verschiedene Faktoren können beim Transfer einer lipophilen Substanz aus oder in eine Modellmembran eine Rolle spielen. So haben neben der jeweiligen Membranzusammensetzung und den physikochemischen Eigenschaften des zu transferierenden Stoffes auch Wechselwirkungen zwischen Phospholipid / Membran und dem einzubauenden Molekül einen entscheidenden Einfluss auf das Verhalten der jeweiligen Formulierung.

Ein Phospholipidmonolayer, wie er bei der Langmuir-Filmwaage Anwendung findet, stellt strukturell das denkbar einfachste Membranmodell dar. Ferner lassen sich an der Filmwaage verschiedene Parameter – beispielsweise die Filmzusammensetzung, Oberflächenspannung, Art und Temperatur der Subphase – relativ einfach variieren, sodass die gewünschten experimentellen Bedingungen leicht eingestellt werden können. Da die Messung an einer Monoschicht stattfindet, reagiert das System sehr empfindlich gegenüber diesen Größen.

Mithilfe dieses Setups galt es zum einen, mögliche Wechselwirkungen von mTHPC mit Phospholipiden näher zu untersuchen und zum anderen, Parameter zu identifizieren, die beim Transfer von lipophilen Substanzen aus Liposomen an Modellmembranen eine Rolle spielen.

3.4.1 Einfluss von mTHPC auf die Eigenschaften von PC-Monoschichten

Abbildung 9 zeigt die Abhängigkeit der Oberflächenspannung von der jedem Molekül zur Verfügung stehenden Fläche und der molaren Zusammensetzung der jeweiligen Monoschicht (π -A-Isothermen). Die entsprechenden Ergebnisse sind in Tabelle 5 zusammengefasst.

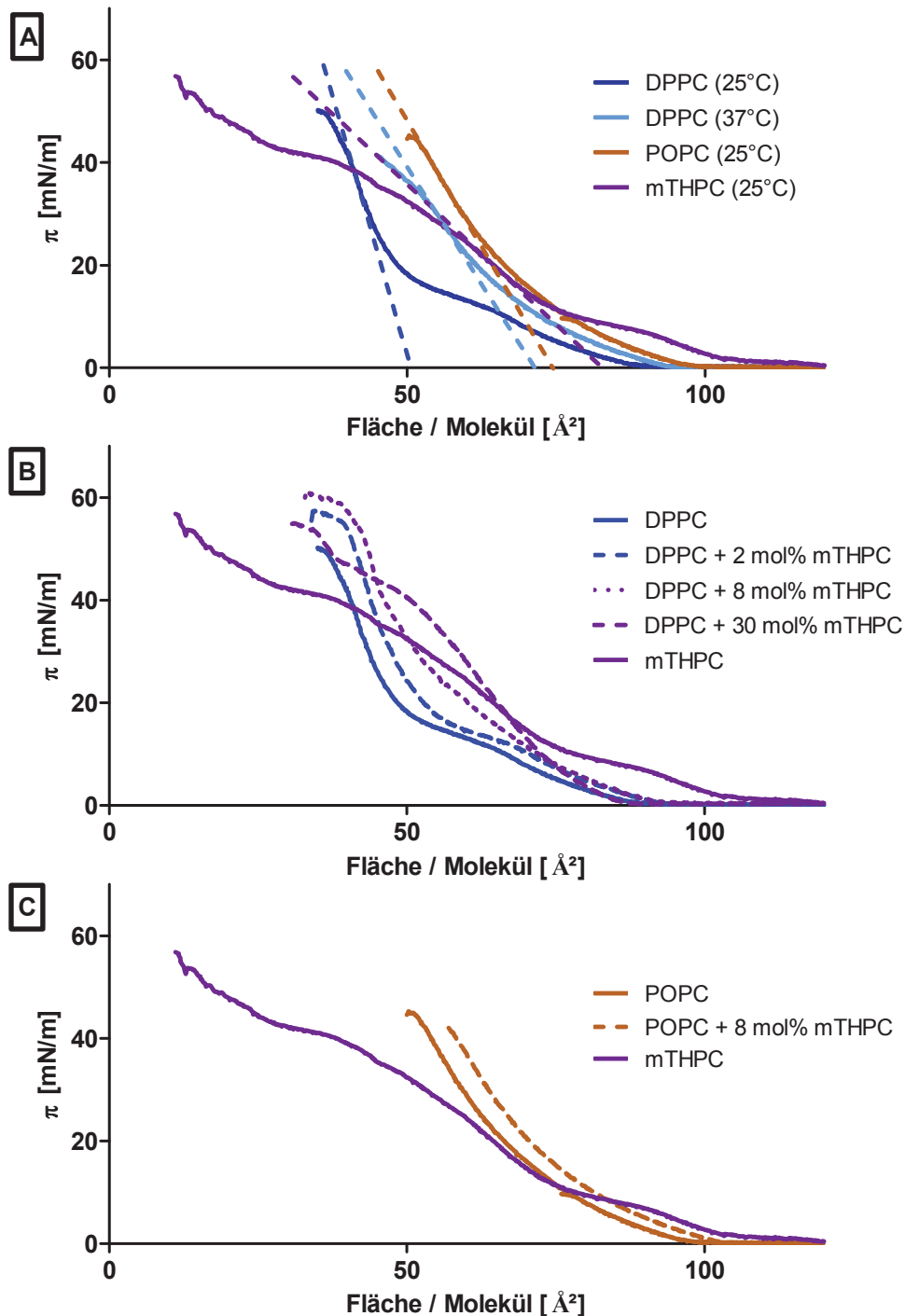


Abbildung 9: Isothermen für (A) reine DPPC-, POPC- und mTHPC-Filme, (B) DPPC / mTHPC-Gemische und (C) POPC / mTHPC-Gemische in jeweils unterschiedlichen molaren Verhältnissen von 1:0 bis 0:1. Gereinigtes Wasser stellte die Subphase dar. Die dazugehörigen Daten sind in Tabelle 5 dargestellt.

Tabelle 5: Kollapsdrücke und Flächen pro Molekül für die aufgenommen Langmuir-Isothermen verschieden zusammengesetzter Monoschichten. Flächen pro Molekül wurden durch Extrapolation der linearen Teile der Isothermen berechnet. ΔA_{Diff} gibt die berechnete Abweichung vom theoretischen Wert an, der sich aus der prozentualen Zusammensetzung und den jeweiligen Einzelflächen der Komponenten ergibt.

Zusammensetzung der molaren Monoschichten	Kollapsdruck π [mN/m]	Fläche / Molekül [Å²]		ΔA_{Diff}	n
		Extrapoliert für $\pi = 0$	Theoretisch	[%]	
Experimente bei 25°C					
DPPC	51,8 ± 1,3	52,57 ± 0,72			6
POPC	43,0 ± 1,3	76,44 ± 1,00			6
mTHPC	55,6 ± 4,9	81,18 ± 2,90			6
DPPC + 0,8 % mTHPC	55,5 ± 1,2	52,85 ± 0,72	52,79	0,1	3
DPPC + 2 % mTHPC	56,8 ± 0,4	54,05 ± 0,91	53,13	1,7	3
DPPC + 4 % mTHPC	56,4 ± 1,9	54,91 ± 1,95	53,67	2,3	6
DPPC + 8 % mTHPC	57,7 ± 4,2	56,51 ± 2,04	54,69	3,3	6
DPPC + 12 % mTHPC	57,2 ± 1,7	61,60 ± 2,25	55,63	10,7	6
DPPC + 20 % mTHPC	57,0 ± 3,3	72,56 ± 0,21	57,34	26,5	3
DPPC + 30 % mTHPC	56,5 ± 1,4	78,16 ± 1,11	59,17	32,1	3
POPC + 8 % mTHPC	42,6 ± 1,6	79,24 ± 0,90	76,79	3,2	3
Experimente bei 37°C					
DPPC	44,8 ± 2,6	77,90 ± 3,60			5
mTHPC	54,2 ± 5,6	74,83 ± 7,27			5
DPPC + 8 % mTHPC	44,1 ± 1,6	79,35 ± 0,69	77,67	2,2	3

Obwohl Ergebnisse solcher Isothermen generell vielen experimentellen Variablen unterliegen (Huynh et al. 2014), stehen die gemessenen Daten für die Phospholipide in gutem Einklang mit bereits veröffentlichten Werten (Yun 2003, Moghaddam et al. 2011). Exemplarisch sei die Isotherme von DPPC bei 25 °C beschrieben. Die Isotherme von DPPC zeigte bei 25 °C drei Phasenübergänge. Zunächst konnte ein Übergang vom koexistierenden gasförmig-flüssig-expandierten Zustand in den flüssig-expandierten Zustand beobachtet werden. Dieser tritt auf, sobald π steigt. Der vorherige Übergang vom gasförmigen in den koexistenten Zustand war unter den gewählten Bedingungen nicht zu erkennen. Er tritt üblicherweise für Flächen ≥ 200 Å²/Molekül auf (Ma und Allen 2006). Es schloss sich ein zweiter Übergang vom flüssig-expandierten in den flüssig-kondensierten Zustand bei einer Fläche von ca. 80 Å²/Molekül und einem Lateraldruck von 10 mN/m an. Im folgenden Plateau liegen beide Phasen in Koexistenz vor (Kaganer et al. 1999, Yun 2003, Ma und Allen 2006). Zusätzlich trat ein dritter Übergang

bei ca. $45 \text{ \AA}^2/\text{Molekül}$ und 40 mN/m auf. Dieser wird als fester Übergang beschrieben und wird durch ein Aufrichten der gekippten Phospholipide – hier im flüssig-kondensierten Zustand – auf der Oberfläche eingeleitet. Anschließend kollabierte der Film bei $51,8 \pm 1,3 \text{ mN/m}$. Der extrapolierte Platzbedarf pro DPPC-Molekül für $\pi = 0 \text{ mN/m}$ lag bei $52,57 \pm 0,72 \text{ \AA}^2$.

Interessanterweise konnte der dritte Phasenübergang für DPPC nicht beobachtet werden, wenn die Versuchstemperatur auf 37°C erhöht wurde. Dieses Phänomen wird in der Literatur dadurch begründet, dass sich die Phospholipidmoleküle schlechter in einen geordneten Zustand packen lassen (Yun 2003). Eine Ursache hierfür liegt z.B. in der höheren Flexibilität der mittel- oder langkettigen Fettsäurereste durch Temperaturerhöhung. Mit steigender Temperatur nimmt π als Ergebnis der höheren thermischen Bewegung der Ketten zu (Yun 2003). In der Folge stieg auch der ermittelte Platzbedarf auf $77,90 \pm 3,60 \text{ \AA}^2$. Gleichzeitig zeigte sich eine Verschiebung des zweiten Phasenübergangs zu höheren Drücken. Die verringerten hydrophoben Wechselwirkungen wirken sich auch auf den Kollapsdruck aus. Der DPPC-Film kollabierte bei 37°C bereits bei $44,8 \pm 2,6 \text{ mN/m}$.

POPC zeigt im Vergleich zu DPPC keine flüssig-kondensierte Phase und auch nicht das dazugehörige Plateau (Worthman et al. 1997). Hier liegt der Grund für die verringerte Kompaktierbarkeit der Phospholipide in der Doppelbindung einer enthaltenen Fettsäure (Yun 2003). POPC liegt nach dem Übergang in den flüssig-expandierten Zustand in diesem vor. Ein linearer Anstieg beginnt erst kurz vor dem Kollaps bei $60 \text{ \AA}^2/\text{Molekül}$ und ca. 30 mN/m . Daraus resultiert eine extrapolierte Fläche von $81,18 \pm 2,90 \text{ \AA}^2/\text{Molekül}$ und ein verringerter Kollapsdruck von $43,0 \pm 1,3 \text{ mN/m}$.

Der Zusatz von Temoporfin in den aufgetragenen DPPC-Film veränderte dessen Eigenschaften (Abbildung 9B, Tabelle 5). Zum einen konnte gezeigt werden, dass der Kollapsdruck bei Komprimierung auf $55,5 \pm 1,2 \text{ mN/m}$ anstieg, wenn dem Phospholipid lediglich $0,8 \text{ mol\%}$ mTHPC hinzugefügt wurde. Er blieb bei weiterer Zugabe des lipophilen Arzneistoffs weitestgehend konstant und erreichte ein Maximum für 8 mol\% bei $57,7 \pm 4,2 \text{ mN/m}$. Dieser Wert liegt auch in dem Bereich, in dem ein reiner mTHPC-Film kollabiert ($55,6 \pm 4,9 \text{ mN/m}$). Zum anderen konnte beobachtet werden, dass sich der zweite Phasenübergang mit steigendem mTHPC-Gehalt zu größeren π verschob, wohingegen der dritte Phasenübergang ab einem Zusatz von über 8 mol\% der Modellschubstanz nicht mehr vorhanden war. Aus den vorangegangenen Betrachtungen lässt sich daher schlussfolgern, dass der lipophile Photosensitizer einen ähnlichen Einfluss auf die Beweglichkeit der Fettsäureketten in der Monoschicht hat, wie das Vorhandensein von Doppelbindungen oder eine Temperaturerhöhung. Worthman et al. beschrieben einen ähnlichen Effekt für einen DPPC-Monolayer, dem Cholesterol zugesetzt wurde. Hier verschwand der Übergang vom flüssig-expandierten in den flüssig-kondensierten Zustand für Cholesterolanteile $\geq 10 \text{ mol\%}$.

(Worthman et al. 1997). Cholesterol ist dafür bekannt, Membranen unterhalb der Phasenübergangstemperatur T_c flüid zu machen (Eeman und Deleu 2010). Decker et al. konnten zeigen, dass der Einbau von mTHPC einen POPC/POPG-Bilayer flüid macht. Einen gegenteiligen Effekt konnten sie für einen rigiden DPPC-DPPG Bilayer beobachten, diesen jedoch nicht mit dem vorgestellten Modell erklären (Decker et al. 2012). Dragicevic-Curic et al. berichteten dagegen von einer Abnahme der Fluidität von Invasomen, wenn mTHPC eingebaut wurde (Dragicevic-Curic et al. 2011). Bei Invasomen handelt es sich um sehr flexible Vesikel, die die Wirkstoffpenetration durch die Haut verbessern sollen. Dragicevic et al. setzten der Formulierung hierfür Ethanol und Terpene hinzu.

Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass die durchschnittliche, einem Molekül zur Verfügung stehende Fläche mit zunehmendem mTHPC-Gehalt zunahm. Dies liegt neben dem genannten Effekt auch daran, dass ein Temoporphinmolekül mit $81,18 \pm 2,90 \text{ \AA}^2$ einen größeren Platzbedarf hat als ein entsprechendes Phospholipid. Interessanterweise sind die ermittelten Werte allerdings nicht linear zur hinzugefügten Menge an mTHPC und stets größer als die zuvor – auf Grundlage der jeweiligen Isothermen – berechneten theoretischen Flächen. Dabei nehmen die Abweichungen mit steigendem mTHPC-Gehalt zu, besonders für Temoporfinzusätze von mehr als 8 mol%. Werden dem DPPC-Film 30 mol% des Photosensitizers hinzugefügt, beträgt der Unterschied zwischen dem berechneten und ermittelten Wert z.B. 32,1 %. Hamor et al. bestimmten mittels Röntgenstrukturanalyse eine Querschnittsfläche des Porphyringerüsts von ca. 200 \AA^2 ($1,5 \text{ nm} \times 1,4 \text{ nm}$) (Hamor et al. 1964). Der im Rahmen der durchgeführten Experimente bestimmte Wert ($81,18 \pm 2,90 \text{ \AA}^2/\text{Molekül}$) lässt vermuten, dass das Molekül nicht planar auf der Oberfläche aufliegt, sondern eine schräge Position einnimmt oder Aggregate bildet. Die beobachteten Flächenzuwächse können daher auf eine Zunahme der Beweglichkeit der Fettsäureketten, einer Veränderung der Lage des mTHPC Moleküls auf der Oberfläche, einer vermehrten Monomerisierung oder aber einer Überlagerung aller Phänomene beruhen.

3.4.2 Transferverhalten lipophiler Modellschubstanzen an Monoschichten

3.4.2.1 Charakterisierung der Formulierungen

Die Partikelgröße und Partikelgrößenverteilung der am Langmuir-Trog untersuchten Formulierungen, sowie die Einschlusseffizienz der in den jeweiligen Bilayer eingebauten Arzneistoffe sind in Tabelle 6 zusammengefasst.

Alle Formulierungen zeigten Partikelgrößen im Bereich zwischen 100 und 150 nm im Durchmesser. PDIs im Bereich von 0,1 und weniger deuten jeweils auf eine monomodale Partikelgrößenverteilung hin.

Cholesterol, Curcumin und mTHPC konnten vollständig in den entsprechenden Bilayer eingebaut werden. Dagegen konnten nur ca. 80 % der eingesetzten Mengen an Nelfinavir und

Propofol und lediglich 51 ± 10 % an Estradiol nach Ultrazentrifugation in den Liposomen wiedergefunden werden. Damit konnte für Estradiol gezeigt werden, dass sich der Wirkstoff schlechter in rigide als in fluide Membranen einbauen lässt. Selbiges haben Bowey et al. berichtet (Bowey et al. 2014), die das mit der engeren Lipidpackung begründen. Diese Eigenschaft konnte (in geringerem Aumaß) auch für Nelfinavir beobachtet werden (80% bzw. 87%), wohingegen sich Propofol ähnlich gut in eine rigide DPPC/DPPG-Membran (88%) einbauen ließ wie in EPC/EPG-Liposomen (85%). Formulierungen, die sowohl für die Inkubationsversuche als auch für die Versuche am Langmuir-Trog hergestellt wurden, wiesen vergleichbare Einschlusseffizienzen auf.

Die gemessenen Größen und Größenverteilungen sowie die Einschlusseffizienz blieben über einen Zeitraum von 4 Wochen konstant.

Tabelle 6: Zusammensetzung, Partikelgröße und Partikelgrößenverteilung (PDI) der am Langmuir-Trog untersuchten Formulierungen sowie die Einschlusseffizienz (EE) der jeweiligen Arzneistoffe in den Bilayer. Die Liposomen wurden in Reinstwasser hergestellt.

Nr.	Formulierung	log P _{API}	z- Average [d. nm]	PDI	EE [%]
1	POPC/POPG (9:1 (m/m), 20 mg/ml) Curcumin (8 mol %)	3,29 ¹	107 ± 1	0,11 ± 0,01	100 ± 1
2	DPPC/DPPG (9:1 (m/m), 20 mg/ml) Curcumin (8 mol %)	3,29 ¹	131 ± 1	0,11 ± 0,01	100 ± 1
3	DPPC/DPPG (9:1 (m/m), 20 mg/ml) Curcumin (0,8 mol %)	3,29 ¹	112 ± 1	0,09 ± 0,01	100 ± 1
4	DPPC/DPPG (9:1 (m/m), 20 mg/ml) Estradiol (8 mol %)	4,01 ¹	110 ± 3	0,11 ± 0,03	51 ± 10
5	DPPC/DPPG (9:1 (m/m), 20 mg/ml) mTHPC (8 mol %)	8,8* ¹ 9,24 ³	112 ± 2	0,09 ± 0,01	99 ± 2
6	DPPC/DPPG (9:1 (m/m), 20 mg/ml) Nelfinavir (8 mol %)	5,7* ¹ 4,07 ²	101 ± 2	0,06 ± 0,02	79 ± 2
7	DPPC/DPPG (9:1 (m/m), 20 mg/ml) Propofol (8 mol %)	3,79 ¹	125 ± 2	0,10 ± 0,02	88 ± 1
8	DPPC/DPPG (9:1 (m/m), 20 mg/ml) Cholesterol (30 mol %)	8,7* ¹	155 ± 2	0,12 ± 0,01	100 ± 1
9	DPPC/DPPG (9:1 (m/m), 20 mg/ml)		127 ± 1	0,08 ± 0,01	

aus „Pubchem“ (NCBI 2004-2016)

¹ aus „Viracept (Product Monograph)“ (Pfizer Canada Inc. 2012)

² aus Chen et al. 2011

* Berechnet mit XLogP3

3.4.2.2 Methodenentwicklung

Die Methodenentwicklung wurde mithilfe von rigiden DPPC/DPPG- und fluiden POPC/POPG-Liposomen durchgeführt, die mit entsprechenden Mengen an Curcumin beladen wurden. Diese Formulierungen wurden gewählt, da sich Curcumin zum einen im untersuchten Bereich zwischen 0,8 und 8 mol% komplett in die Doppelschicht eingebaut werden konnte und gleichzeitig – im Vergleich zu mTHPC – eine geringere Lichtempfindlichkeit aufwies, was die experimentelle Handhabung erleichterte. Zeitgleich zeigte die Substanz – im Vergleich zu Cholesterol (Vgl. Tabelle 7) – eine schnelle Transferkinetik, was den zeitlichen Rahmen der Versuche deutlich verkürzte.

Auf die Oberfläche wurde ein POPC-Film aufgetragen, da dieser in der Praxis über einen längeren Zeitraum stabil gehalten werden konnte als beispielsweise ein DPPC-Film und im gewählten Bereich für π keine Phasenübergänge besaß.

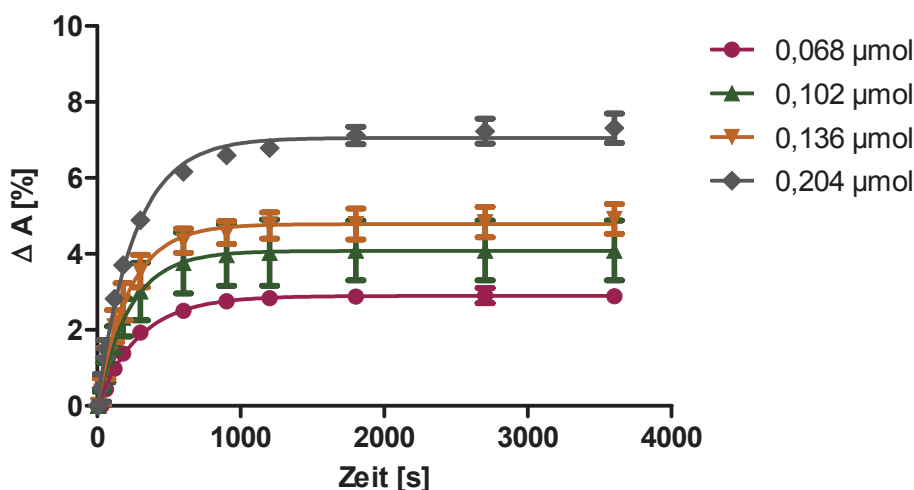


Abbildung 10: Transferverhalten von Curcumin aus DPPC/DPPG-Liposomen (9:1 (m/m)) an einen POPC-Film bei $\pi = 25$ mN/m. Dargestellt ist der Einfluss des Liposomen/POPC-Verhältnisses. Der Film enthielt ca. 6×10^{-9} mol POPC. Die Kurven entsprechen dem relativen Flächenzuwachs der Monoschicht über die Zeit nach Zugabe unterschiedlicher Stoffmengen an liposomalen Lipid in die Subphase. Dargestellt sind die entsprechenden Mittelwerte für jeweils mindestens drei unabhängige Experimente. Die Kurven wurden mithilfe einer einfachen exponentiellen Funktion extrapoliert. Die dazugehörigen Daten befinden sich in Tabelle 7A ($n \geq 3$).

In einem ersten Versuch wurde der Einfluss verschiedener Parameter auf den Wirkstofftransfer an die Monoschicht untersucht. Dabei konnte festgestellt werden, dass der Transfer von der Anzahl der beladenen Liposomen in der Subphase und deren Beladung abhängig ist. Es konnte ein linearer Zusammenhang zwischen dem relativen Flächenzuwachs des POPC-Films und der hinzugegebenen Menge einer DPPC/DPPG-Formulierung bei konstanter Oberflächenspannung gefunden werden. Die dazugehörigen Ergebnisse sind in Tabelle 7A und B zusammengefasst. Im untersuchten Bereich von 0,068 bis 0,204 μmol hinzugefügtem liposomalem Lipid waren die Ergebnisse sehr gut reproduzierbar und die

gemessenen Kinetikfunktionen als relativer Flächenzuwachs über die Zeit konnten mit einer einfachen exponentiellen Funktion dargestellt werden (Abbildung 10).

Die Halbwertszeit betrug unter den gewählten Versuchsbedingungen jeweils ca. 3 Minuten. Wurde das Volumen der in die Subphase injizierten Formulierung allerdings über diesen Bereich hinaus erhöht, konnte beobachtet werden, dass der Film zwar weiterhin linear zur hinzugefügten Liposomenmenge expandierte, die Halbwertszeiten jedoch zunahmen und die Versuche generell schlechter reproduzierbar waren (Daten nicht gezeigt). Weiterhin ließen sich die entsprechenden Kinetiken auch nicht mehr mit einer einfachen exponentiellen Funktion darstellen. Es ist zu vermuten, dass die Kapazitäten des POPC-Films, Curcumin schnell aufzunehmen, bei größeren Wirkstoffmengen abgesättigt werden können oder mit höherem Lipidzusatz noch weitere Effekte – z.B. Fusion von liposomalen Phospholipiden an die Monoschicht – auftreten. In weiteren, hier nicht dargestellten Versuchen konnte beobachtet werden, dass dieses Phänomen auch bei anderen Modellsubstanzen auftrat.

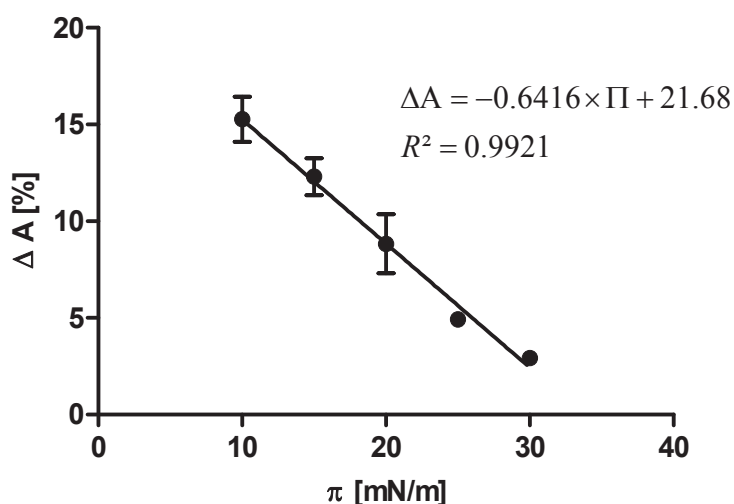


Abbildung 11: Maximaler relativer Flächenzuwachs eines POPC-Monolayers bei verschiedenen π nach Zugabe konstanter Mengen an DPPC/DPPG-Liposomen (9:1 (m/m)) mit einer Beladung von 8 mol% Curcumin in die Subphase. Die Daten entsprechen dem Mittelwert aus mindestens drei unabhängig durchgeführten Experimenten. Die dazugehörigen Daten befinden sich in Tabelle 7C.

Die Halbwertszeit des Transfers sowie der relative Flächenzuwachs waren ebenfalls von der Oberflächenspannung des POPC-Films abhängig, die für den jeweiligen Versuch konstant gehalten wurde (Abbildung 11, Tabelle 7C). Es konnte ein verstärkter Curcumintransfer beobachtet werden, wenn die Phospholipide eine geringere Kompaktierung (= größerer zur Verfügung stehender Platz) besaßen. Gleichzeitig nahm die Transfergeschwindigkeit ab. Der relative Flächenzuwachs verhielt sich dabei linear zur angelegten Oberflächenspannung des Films. Extrapoliert man die erhaltene Funktion, bedeutet dies, dass für $\pi > 33,8$ mN/m kein Curcumin in den Film aufgenommen werden kann. Ein ähnlicher Wert wurde in Literatur bereits für Cyclosporin A beschrieben. Die Autoren korrelierten in dieser Arbeit ihre

Feststellungen mit einer nicht-vorhandenen ZNS-Gängigkeit des Wirkstoffes (Fahr und Reiter 1999).

Interessanterweise war die Halbwertszeit, mit der Curcumin aus einer POPC/POPG-Formulierung an einen POPC-Film transferierte, mit einem Wert von 2,5 Minuten ähnlich der einer DPPC/DPPG-Formulierung mit gleicher Wirkstoffbeladung (Tabelle 7B). Dennoch betrug der Flächenzuwachs in diesem Fall lediglich die Hälfte dessen, was für die rigide Formulierung unter gleichen Bedingungen gemessen werden konnte. Begründet werden kann dies mit einer veränderten Verteilung des Wirkstoffes zwischen Monolayer, Wasser und Liposomenmembran zugunsten des Bilayers. Ein geringerer Flächenzuwachs konnte auch beobachtet werden, wenn die Beladung der rigiden Formulierung herabgesetzt wurde, auch wenn die der Subphase hinzugefügte Menge an Curcumin gleich blieb. In diesem Fall war erhöhte sich jedoch auch der Lipidanteil in der Subphase, was wiederum zu einer Verschiebung des Gleichgewichtes führt. Zusätzlich war der Transfer leicht verlangsamt und eine Halbwertszeit von $3,6 \pm 1,1$ min konnte aus den Messdaten am Trog berechnet werden.

3.4.2.3 Transferverhalten weiterer Modellsubstanzen

Nachdem die Methode zunächst hinreichend entwickelt wurde, galt es im Folgenden das Verhalten von Curcumin im Kontext zu anderen lipophilen Modellsubstanzen zu betrachten. Aus diesem Grund wurden rigide DPPC/DPPG-Liposomen mit gleichen Molmengen dieser Wirkstoffe hergestellt und die erzielten Kinetikdaten mit denen von Curcumin verglichen.

Hierbei musste beachtet werden, dass die Menge an Wirkstoff, die durch den Transfer in den Film eingebaut wurde, ausreichend groß war, um ein signifikantes Flächenwachstum aufnehmen und daraus eine Kinetik bestimmen zu können. Dabei waren sowohl die Molekülgröße, als auch das Verteilungsverhältnis des Wirkstoffes zwischen Wasser, der Mono- und Doppelschicht – gleichbedeutend mit der Affinität zum POPC-Film – wichtige Faktoren. Gleichzeitig musste sichergestellt werden, dass in diesem Bereich der Transfer nicht der zuvor erwähnten Sättigung unterliegt. Daher war es für jeden Wirkstoff zunächst wichtig, die hinzuzugebende Menge an Liposomen individuell zu bestimmen. Die entsprechenden Werte sind in Tabelle 7D zusammengefasst. Unter den untersuchten Modellsubstanzen erzeugten Curcumin und Nelfinavir den höchsten relativen Flächenzuwachs bei gleicher Wirkstoffkonzentration in der Subphase. Dagegen musste die zehnfache Menge an Estradiol und Propofol zugesetzt werden, um adäquate Transferkurven aufnehmen zu können. Auch Temoporfin transferierte in einem geringeren Ausmaß aus der Doppel- an die Monoschicht.

Tabelle 7: Transfereigenschaften verschiedener Substanzen aus liposomalen Doppelschichten an eine POPC-Monoschicht. Dabei wurde der Einfluss des (A) Donor-Akzeptor-Verhältnisses, (B) der Lipidzusammensetzung und Beladung der liposomalen Formulierung mit Curcumin als Modellschicht und (C) der Oberflächenspannung der Monoschicht untersucht. Zusätzlich wurde (D) das Transferverhalten für verschiedene lipophile Modellschichten aus DPPC/DPPG Liposomen bestimmt. Die Subphase, in welche die Liposomen injiziert wurden, bestand dabei aus gereinigtem Wasser und wurde kontinuierlich gerührt. Der Monolayer bestand aus ca. $6 \cdot 10^{-9}$ mol POPC.

	Lipidzusammensetzung	π [mN/m]	Hinzugefügtes liposomales Lipid [μ mol]	$t_{0,5}$ [s]	ΔA [%]	n
A	DPPC/DPPG/Curcumin 8 %	25	0,068	209 ± 48	$2,89 \pm 0,19$	3
	DPPC/DPPG/Curcumin 8 %	25	0,102	160 ± 15	$4,09 \pm 0,79$	4
	DPPC/DPPG/Curcumin 8 %	25	0,136	158 ± 39	$4,92 \pm 0,35$	5
	DPPC/DPPG/Curcumin 8 %	25	0,204	179 ± 14	$7,31 \pm 0,39$	4
B	DPPC/DPPG/Curcumin 8 %	25	0,136	209 ± 48	$4,92 \pm 0,35$	5
	DPPC/DPPG/Curcumin 0,8 %	25	1,360	214 ± 63	$3,79 \pm 0,86$	5
	POPC/POPG/Curcumin 8 %	25	0,131	158 ± 44	$2,18 \pm 0,27$	3
C	DPPC/DPPG/Curcumin 8 %	10	0,136	572 ± 40	$15,27 \pm 1,17$	3
	DPPC/DPPG/Curcumin 8 %	15	0,136	345 ± 31	$12,30 \pm 0,96$	3
	DPPC/DPPG/Curcumin 8 %	20	0,136	282 ± 32	$8,83 \pm 1,53$	3
	DPPC/DPPG/Curcumin 8 %	25	0,136	209 ± 48	$4,92 \pm 0,35$	5
	DPPC/DPPG/Curcumin 8 %	30	0,136	185 ± 39	$2,92 \pm 0,26$	3
D	DPPC/DPPG	25	1,360	-	-	3
	DPPC/DPPG/Cholesterol 30 %	25	0,680	>3600	-	3
	DPPC/DPPG/Curcumin 8 %	25	0,136	209 ± 48	$4,92 \pm 0,35$	5
	DPPC/DPPG/Estradiol 8 %	25	1,360	168 ± 46	$1,41 \pm 0,63$	3
	DPPC/DPPG/mTHPC 8 %	25	0,816	383 ± 56	$2,61 \pm 0,42$	4
	DPPC/DPPG/Nelfinavir 8 %	25	0,272	179 ± 40	$5,65 \pm 1,13$	5
	DPPC/DPPG/Propofol 8 %	25	1,360	113 ± 47	$1,59 \pm 0,42$	3

Unbeladene DPPC/DPPG-Liposomen wurden als Kontrolle verwendet, um eine Flächenänderung, z.B. durch Fusion, ausschließen zu können. Dieser wurde u.a. von Hernandez-Borrell et al. für DPPC-Liposomen an einen DPPC-Cholesterol-Film beschrieben. Sie konnten zeigen, dass geringe π , hohe Ca^{2+} -Konzentrationen in der Subphase und zunehmende Liposomenvolumina den Einbau des liposomalen Lipids begünstigen und zu einem Anstieg des Lateraldrucks bei konstanter Oberfläche führten (Hernandez-Borrell et al. 1990). Unter den von uns gewählten Bedingungen (Messung des Flächenzuwachses bei konstantem Lateraldruck) konnte jedoch weder nach der Herstellung, noch nach vierwöchiger Lagerung der Liposomen bei 4°C eine signifikante Veränderung der Filmfläche innerhalb von 3600 s festgestellt werden.

Nelfinavir und Estradiol zeigten ähnliche Transfereigenschaften wie Curcumin. Dagegen transferierten 50 % des Propofols bereits innerhalb von 113 ± 47 s in den POPC-Film. Die Daten stehen dabei im guten Einklang mit der von Fahr und Reiter ermittelten Halbwertszeit von 150 ± 42 s für den Transfer von liposomalem Cyclosporin A in einen DOPC-Monolayer (Fahr und Reiter 1999). Temoporfin wiederum zeigte von den untersuchten, therapeutisch eingesetzten Substanzen mit einer Halbwertszeit von 383 ± 56 s das langsamste Transferverhalten.

Mit noch deutlicherer Verzögerung transferierte Cholesterol, welches für seine besonders gute Affinität zu Phospholipiden bekannt ist und auch in biologischen Membranen vorkommt (Cooper 1978). Prinzipiell waren die Transferversuche für diese Formulierung am schlechtesten reproduzierbar, zeigten jedoch in jedem Einzelexperiment Halbwertszeiten von mehr als einer Stunde. Die Ergebnisse korrelieren dabei sehr gut mit Untersuchungen von Fahr und Seelig, die sich mit dem Transfer von Cholesterol aus Donor- in Akzeptorliposomen beschäftigten. Hier konnte gezeigt werden, dass dieses Molekül nur relativ langsam, mit einer berechneten Halbwertszeit von 60 min (3600 s), ausgetauscht wurde. Cyclosporin A dagegen transferierte mit einer Zeitkonstante von 270 s (Fahr und Seelig 2001). Auch McLean und Phillips bestimmten die Austauschgeschwindigkeit von Cholesterol zwischen Liposomen. Sie berechneten eine Halbwertszeit von $2,3 \pm 0,3$ h, die von der Cholesterolbeladung unabhängig war (McLean und Phillips 1981). Als Ursache für diesen Effekt wird die strukturelle Ähnlichkeit zu Phospholipiden beschrieben, die dafür sorgt, dass es nur durch Flip-Flop-Bewegungen des Bilayers in die wässrige Phase freigesetzt und durch eine andere Membran aufgenommen werden kann. Wirkstoffe, die diese Ähnlichkeit nicht aufweisen, benötigen diesen Schritt nicht (Fahr et al. 2005).

Liposomen, die eine Beladungseffizienz von weniger als 100 % besaßen, wurden vorab mithilfe von Ultrazentrifugation von freiem Wirkstoff abgetrennt. Überraschenderweise zeigten Liposomen, die auf diese Weise aufgereinigt wurden, im Hinblick auf den Flächenzuwachs und die Zeitkonstante ähnliche Transfereigenschaften wie die entsprechende Formulierung, die nach der Herstellung nicht weiter aufgearbeitet wurde, wenn eine äquivalente Menge an Wirkstoff der Subphase zugesetzt wurde. Eine mögliche Interpretation dieser Beobachtung liegt darin, dass die Absorption des Wirkstoffs in den POPC-Film den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt in diesem Versuchsaufbau darstellt. Dies setzt voraus, dass Teile der untersuchten Wirkstoffe unter den gewählten Bedingungen schnell aus der Liposomenmembran in die wässrige Subphase freigesetzt werden. Bei einer Verdünnung um den Faktor 600 bis 12.000, wie sie hier experimentell gewählt wurde, erscheint dies für die entsprechenden Moleküle ein möglicher Effekt zu sein. Dieser bestätigt auch die Beobachtungen, die für die gleichen APIs an der AF4 gemacht werden konnten (Vergleiche 3.3.2). Gleichzeitig kann durch eine permanente Homogenisation der Subphase

gewährleistet werden, dass der Wirkstoff an die Monoschicht transportiert wird. In diesem Fall würden direkte Transfereffekte zwischen Liposomenmembran und Monoschicht (z.B. durch Kollision) nur eine untergeordnete Rolle spielen, wohingegen sie einen möglichen Transfermechanismus für fester in den Bilayer verankerte Substanzen (z.B. Cholesterol und in geringerem Ausmaß mTHPC) beschreiben können, die nicht in diesem Maße durch eine Verdünnung freigesetzt werden. Der Übergang in den Monolayer erfolgte aus selbigen Gründen ebenfalls nicht quantitativ, sodass nur ein sehr geringer Anteil der Wirkstoffe in die Phospholipidschicht aufgenommen wurde ($< 5\%$), während die restlichen Mengen im liposomalen Bilayer verblieben oder in der wässrigen Phase gelöst vorlagen.

4 Abschlussdiskussion

Eine Vielzahl der sich auf dem Markt oder in der klinischen Entwicklung befindlichen Wirkstoffe zeigt eine schlechte Löslichkeit in wässrigen Systemen. Liposomale Formulierungen stellen eine Möglichkeit dar, diese Substanzen trotzdem therapeutisch zu verabreichen. Am Beispiel des Photosensitizers mTHPC (Temoporfin) – der den Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit bildete – konnte in vorangegangenen Arbeiten gezeigt werden, dass die DPPC/DPPG-Formulierung Foslip® und die PEGylierte Form Fospeg® im Vergleich zur ethanolhaltigen Lösung Foscan® verbesserte pharmakokinetische Eigenschaften zeigen. Die Möglichkeit des passiven Targetings erlaubte es zusätzlich, den Wirkstoff gezielt im Tumorgewebe anzureichern (Buchholz et al. 2005, de Visscher et al. 2011, Bovis et al. 2012, Reshetov et al. 2013) und die Dosis zu reduzieren. In Verbindung mit einer verstärkten Monomerisierung von mTHPC-Aggregaten konnten so gleichzeitig die Pharmakodynamik als auch die Verträglichkeit erhöht werden (Compagnin et al. 2011, Decker 2013).

Eine Voraussetzung für diesen Effekt ist, dass die Formulierung im Blutkreislauf ausreichend stabil ist und der Wirkstoff im Vesikel verbleibt (Decker 2013). Wirkstoffe, die in der inneren hydrophilen Phase des Liposoms verkapselt vorliegen, werden durch den Abbau der Vesikel, Diffusion durch den Bilayer oder spezifische Mechanismen am Wirkort freigesetzt. APIs (z.B. mTHPC), die in die Membran eingebaut werden, stehen zusätzlich im stetigen Kontakt zu potentiellen Akzeptoren, z.B. Plasmaproteinen oder Erythrozyten. Auf diesem Weg ist es möglich, dass sie bereits vorher das Vehikel verlassen und sich lediglich ein leeres Liposom im Tumorgewebe anreichert. Das Verhalten der Formulierung ist in beiden Fällen abhängig von der Membranzusammensetzung (Allen und Cleland 1980, Allen 1981, Decker et al. 2013a, Reshetov et al. 2013) und kann den entsprechenden Anforderungen angepasst werden. Ein Verständnis dafür, welche Faktoren hierfür relevant sind, ist eine Grundvoraussetzung für den jeweiligen Therapieerfolg.

Aus diesem Grund wurden verschiedene Modellsysteme entwickelt, um das Transferverhalten lipophiler Wirkstoffe aus Liposomen zu bestimmen. *In vitro*-Methoden stellen dabei eine schnelle und kostengünstige Möglichkeit dar, in einer Art Screening den Einfluss unterschiedlicher Parameter zu untersuchen und anhand der gewonnen Erkenntnisse ein besseres Gefühl für das spätere *in vivo*-Verhalten zu erhalten.

Liposomales mTHPC wird in wässrigen Puffersystemen nicht freigesetzt. Die Zugabe von lipophilen Akzeptoren führt jedoch zum schnellen Wirkstofftransfer (Kachatkou et al. 2009). Für mTHPC wurden daher eine Reihe von Systemen vorgestellt, die den Transfer auf lipophile Modellmembranen (Petersen et al. 2010, Hefesha et al. 2011) oder Blutbestandteile (Reshetov et al. 2011, Reshetov et al. 2012, Decker et al. 2013b, Kaess und Fahr 2014, Holzschuh et al.

2015) untersuchen. Die getätigten Beobachtungen stehen dabei in direktem Zusammenhang mit Daten, die *in vivo* erhoben wurden (Decker et al. 2013a, Reshetov et al. 2013, Xie et al. 2015).

In einer aktuellen Arbeit nutzten Hinna et al. die AF4, um on-line den Transfer des – dem mTHPC strukturell sehr ähnlichen – pTHPPs aus kleinen Donor- an größere Akzeptorliposomen zu untersuchen (Hinna et al. 2014). In der Vergangenheit wurde diese Technik bereits erfolgreich zur Auftrennung von Plasmabestandteilen (Madorin et al. 1997) verwendet.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde erstmals eine Methode beschrieben, die die AF4 verwendet, um den Transfer von mTHPC aus Liposomen an Plasmaproteine zu quantifizieren (Holzschuh et al. 2015). Die erzielten Ergebnisse stehen im Einklang mit bereits zuvor publizierten Daten. Es konnte gezeigt werden, dass diese Methode aufgrund der sehr guten Trennleistung und den verkürzten Messzeiten eine weitere Möglichkeit darstellt, in Form von *in vitro*-Untersuchungen das Verhalten von mTHPC-Liposomen in Hinblick auf eine anschließende *in vivo*-Anwendung besser einzuschätzen.

4.1 *In vitro*-Untersuchungen zum Verhalten liposomaler Formulierungen in humanem Plasma

Nach Injektion in den Blutkreislauf können Liposomen mit verschiedenen Blutbestandteilen interagieren. Wechselwirkungen mit Plasmaproteinen sind dabei das am besten beschriebene und untersuchte Phänomen und können zum Abbau der Vesikel und / oder der Freisetzung des Wirkstoffs führen. Im Fokus stehen dabei vor allem die Lipoproteine HDL, LDL und VLDL, die als natürlicher Transporter für Cholesterol, Phospholipide und Fettsäuren agieren und dementsprechend eine hohe Affinität für diese Moleküle aufweisen (Cox und Garcia-Palmieri 1990, Wirtz 1991). In der Literatur wurde beispielsweise beschrieben, dass Phosphatidylcholin aus der Liposomenmembran auf HDL transportiert wird, was zur Desintegration der Vesikel führt (Scherphof et al. 1978, Allen 1981, Scherphof et al. 1983). Albumin – als das am häufigsten vorkommende Plasmaprotein – stellt ebenfalls eine wichtige Komponente in diesem System dar. Gleichzeitig können diese Strukturen auch als mögliche Akzeptoren für lipophile Wirkstoffe (z.B. mTHPC) auftreten (Michael-Titus et al. 1995).

Sowohl die Stabilität der Vesikel als auch die Bestimmung der freigesetzten Wirkstoffmenge sind folglich wichtige Parameter, die in *in vitro*-Studien in humanem Plasma untersucht werden.

Weinstein et al. beschrieben für Liposomen, in denen Carboxyfluorescein in hoher Konzentration verkapselt vorlag, eine Methode, die anhand von Fluoreszenzquenching in der inneren Phase die Wirkstofffreisetzung beschreibt (Weinstein et al. 1977). Auf diese Weise

ließen sich im Folgenden der Abbau der Vesikel als auch die Freisetzung über Porenbildung in Puffersystemen oder in humanem Plasma quantifizieren (Lelkes und Tandeter 1982). Reshetov et al. nutzten das photoinduzierte Fluoreszenzquenching von mTHPC aus, um die Freisetzung des Wirkstoffes aus den Liposomen auf die gleiche Weise zu quantifizieren (Reshetov et al. 2011, Reshetov et al. 2012, Reshetov et al. 2013). Gleichzeitig untersuchten sie die Stabilität der Vesikel durch Messen der Anzahl der intakten Liposomen mithilfe der NTA-Technologie. Der große Vorteil dieser Vorgehensweise liegt in der schnellen und einfachen Messung, die eine vergleichsweise geringe Probenvorbereitung und keine anschließende Trennung der Donoren und Akzeptoren benötigt. Allerdings sind auf diese Weise lediglich quantitative Aussagen über die Wirkstofffreisetzung und Stabilität möglich. Qualitative Aussagen über die entsprechenden Prozesse – im Speziellen den Abbau der Vesikel – können nicht getroffen werden. Nachteilig ist ebenfalls, dass diese Methode auf Wirkstoffe beschränkt ist, die Fluoreszenzeigenschaften aufweisen, welche sich im Verlauf des Versuches nicht verändern (z.B. Verstärkung / Quenching nach Proteinbindung). Im Falle des Temoporfin ist zusätzlich zu beachten, dass das Molekül zum starken Photobleaching neigt und die resultierenden Photoprodukte unter Umständen andere optische und physikochemische Eigenschaften aufweisen können (Decker 2013).

Radioaktive Marker

In der Vergangenheit wurden ebenfalls radioaktive Marker verwendet, die sensitiv auf die Interaktion von Liposomen mit Plasmaproteinen reagieren. Hydrophile Substanzen – z.B. Inositol (Murata et al. 2000) oder Povidon-Iod (Scherphof und Morselt 1984) –, fanden Anwendung, um ähnlich dem Fluoreszenzmodell Aussagen über Stabilität und Porenbildung zu geben. Des Weiteren wurden lipophile Marker in den Bilayer eingebaut – z.B. Phosphatidylcholin (Damen et al. 1981), Sphingosinphosphat (Murata et al. 2000), Cholesterol (Lange et al. 1983, Letizia und Phillips 1991) oder Cholesterolderivate (z.B. Ester oder Ether) (Green et al. 1989, Decker et al. 2013a) –, um konkrete Aussagen über Austausch und Transport durch Plasmaproteine treffen zu können. Die Wahl des „richtigen“ Markers hängt dabei stark davon ab, welche Effekte untersucht werden sollen.

Originale Bestandteile der Membran eignen sich beispielweise, um die Mechanismen des Vesikelabbaus näher zu untersuchen. So konnten Scherphof et al. mit gelabeltem Phosphatidylcholin zeigen, dass HDL in der Lage ist, Bausteine aus der Membran auszutauschen. Da dieser Austausch für fluide Liposomen in Richtung des Lipoproteins verschoben ist, werden in der Folge Vesikel abgebaut (Scherphof et al. 1978, Chobanian et al. 1979). Der Transfer eines Phospholipids ist unter Gleichgewichtsbedingungen ein vergleichbar energieaufwendiger Prozess (Marrink et al. 1998). Daher ist es nicht verwunderlich, dass der Prozess durch ein Phospholipidtransferprotein (PLTP) stimuliert werden kann (Damen et al. 1980, Damen et al. 1982, Tall et al. 1983). Zusätzlich ist der

Transfer größenabhängig: Für kleine Vesikel ist er stärker ausgeprägt (Scherphof und Morselt 1984). Der Einbau von Cholesterol in eine fluide Membran sorgt dafür, dass diese stabilisiert wird. In der Folge wird der Transport von Phospholipiden an Lipoproteine verringert. Dadurch verschiebt sich das Gleichgewicht, sodass die Vesikel intakt bleiben (Kirby et al. 1980, Damen et al. 1981). Eine Versteifung der Membran, die das Eindringen von Proteinen in die Membran erschwert, kann auch durch Verwendung von Lipiden geschehen, die über langkettige, gesättigte Fettsäuren verfügen. Allen konnte zeigen, dass DSPC-Liposomen in Folge des verringerten Phospholipidtransfers deutlich stabiler sind (Allen 1981).

Soll jedoch ein Marker quantitative Aussagen über die Integrität der Vesikel geben, sollte er nur bei Zerstörung des Vesikels freigesetzt werden. In der Literatur wurden hierfür Cholesteroether (z.B. Cholsteryloleylether (COE)) beschrieben. Dieser Label zeigte in Rattenplasma metabolische Stabilität (Derksen et al. 1987). In *in vitro*-Untersuchungen konnte zudem gezeigt werden, dass er sich nur sehr langsam zwischen zwei Modellmembranen austauscht (Fahr und Seelig 2001).

In unseren Untersuchungen in humanem Plasma konnten wir allerdings feststellen, dass der Label ein Substrat des CETPs ist und dadurch – in Abhängigkeit der Membranrigidität und sterischer Abschirmung – unterschiedlich stark ausgetauscht wird. Da CETP im Rattenplasma nicht vorkommt (Ha und Barter 1982), kann dieser Effekt dort nicht beobachtet werden. Fluide Membranen im flüssig-kristallinen Zustand sind empfindlicher für die Adsorption und das Eindringen von Plasmaproteinen. Dieser Effekt wird durch Doppelbindungen in den Lipidketten unterstützt (Scherphof et al. 1978, Allen 1981, Wirtz 1991). Entsprechende Phospholipide weisen beispielsweise in Untersuchungen an der Filmwaage eine lockere Packungsdichte auf, besitzen einen höheren Platzbedarf und kollabieren bei Komprimierung bei geringeren Lateraldrücken (Yun 2003, Moghaddam et al. 2011). Folglich war es nicht verwunderlich, dass CETP in der Lage war, den COE-Label aus EPC/EPG-Membran „herauszuziehen“ und auf ein Lipoprotein zu transferieren. Dieser Effekt konnte ebenso für SPC-, POPC/POPG- und DOPC/DOPG-Membranen beobachtet werden, deren Lipidketten ebenfalls Doppelbindungen aufweisen. Der COE-Transfer konnte im Falle von DOPC/DOPG-Liposomen auch nicht gänzlich durch den CETP-Inhibitor Torcetrapib unterbrochen werden. Offensichtlich ist diese Membran sehr einfach zu penetrieren, sodass der Label noch über einen anderen Mechanismus freigesetzt werden kann. Für diesen Fall stellt die Verwendung eines Phospholipidlabels eine Alternative zu der Kombination aus COE und CETP dar. Aber auch dieser kann – wie oben bereits beschrieben – ausgetauscht werden. Ferner unterliegt er einer Hydrolyse, die sowohl während der Lagerung als auch der Inkubation auftreten kann. Je nach Lokalisation des Labels kann die daraus gebildete Fettsäure andere Transfer- und Bindungseigenschaften aufweisen als das zugehörige Phospho- bzw. Lysolipid (Hamilton und Cistola 1986, Murata et al. 2000, Holzschuh et al. 2015). Ein Cholesterollabel ist dahingehend

für diese Zwecke ungeeignet, als dass er durch Diffusion und Kollision auf einen lipophilen Akzeptor übertragen werden kann (Fahr et al. 2005). Zusätzlich verestert die Lecithin-Cholesterol-Acyltransferase (LCAT) gebundenes Cholesterol an der Oberfläche von HDL mit einer Fettsäure (Aron et al. 1978), wodurch ein Rücktransfer verhindert wird.

Viele Marker stehen ^3H - oder ^{14}C -gelabelt zur Verfügung. Wegen ihrer geringeren Reichweite und kürzeren Halbwertszeit, gelten ^3H -Label als sicherer. Dem gegenüber steht jedoch ein potentieller metabolischer Transfer des Tritiums auf andere Substrate, was zur Verfälschung der Aussage führen kann (Krauser 2013). Diese Zusammenfassung zeigt, dass die Auswahl des „richtigen“ Lipidlabels dem Versuchsaufbau angepasst werden muss. Die Eignung der jeweiligen Label hängt dabei von verschiedenen Parametern – z.B. Versuchsziel, Membranfluidität, Preis u.a. – ab (Holzschuh et al. 2015).

Methoden der Probenauftrennung

In vitro-Versuche bieten gegenüber *in vivo*-Versuchen gewisse Vorteile: Durch die Einführung eines standardisierten Systems ist es möglich, eine Vielzahl an Versuchen in zumeist kurzen Zeiträumen durchzuführen. Häufig weisen diese Methoden auch eine vereinfachte Probenhandhabung und einen deutlich geringeren Aufwand auf, als es beispielsweise bei Tier- oder gar Humanversuchen der Fall ist. Dem gegenüber sollte dem Experimentator jedoch bewusst sein, dass die erzielten Ergebnisse stark den gewählten experimentellen Bedingungen unterliegen und daher die gewonnen Erkenntnisse lediglich unterstützend zum Verständnis von Mechanismen und dem späteren *in vivo*-Verhalten herangezogen werden können.

Die beschriebenen Untersuchungen verlangen in der Regel eine Auftrennung von Liposomen und Plasmaproteinen nach Inkubation. Dies geschah in der Vergangenheit üblicherweise mithilfe der SEC. Studien, die sich mit der selektiven Interaktion zwischen HDL oder anderen isolierten Plasmabestandteilen und Vesikeln beschäftigten, konnten sich auch der Ultrazentrifugation unter Verwendung eines Dichtegradienten bedienen (Chobanian et al. 1979, Guo et al. 1980). Diese Art der Auftrennung eignet sich jedoch durch Überlappung der Dichten und zusätzlicher Adsorption von Proteinen an die Liposomenoberfläche (Veränderung der Dichte) nicht für eine Inkubation in humanem Plasma (New 1990). SEC bietet zudem die einfachere Probenvor- und -aufbereitung. Durch Anbindung unterschiedlicher Detektoren können zudem on-line-Charakterisierungen durchgeführt werden. Denkbar wären beispielsweise Methoden der Partikelgrößenanalyse oder eine quantitative Bestimmung des freigesetzten Wirkstoffs über UV/Vis- oder Fluoreszenzspektrometrie. Dabei ist allerdings auf die jeweiligen Detektionsgrenzen zu achten. Ebenso ermöglicht eine Auftrennung der Probe eine simultane Bestimmung der Vesikelstabilität und der Wirkstoffverteilung. Durch die Wahl des entsprechenden Säulenmaterials für den jeweiligen Größenbereich und die Möglichkeit

der linearen Kopplung mehrerer Säulen kann die Methode einfach den gewünschten Parametern angepasst werden. Dennoch korreliert die Trennleistung der SEC stark mit der Zeit: Eine lange Trennstrecke und geringe Flussraten begünstigen zwar eine Separation einzelner Fraktionen, führen jedoch gleichzeitig dazu, dass eine Einzelmessung über mehrere Stunden dauern kann (Decker et al. 2013b, Kaess und Fahr 2014). Interaktionen der Probe mit dem Säulenmaterial können die Trennleistung und Ergebnisse zusätzlich beeinflussen. In der Praxis werden die Säulen daher üblicherweise mit dem aufzutrennenden Analyten (z.B. Liposomen) vorgesättigt (Ruyschaert et al. 2005).

Asymmetrische Fluss Feld-Fluss Fraktionierung konnte als eine alternative Methode für diese Art der Auftrennung etabliert werden. Ihre Vorteile lagen dabei in der kürzeren Laufzeit bei guter Auftrennung und geringeren Interaktionen mit der stationären Phase (Wagner et al. 2014). Gerade erstere reduziert beispielsweise den Probendarf, da nahezu alle Proben aus einem Inkubationsansatz gezogen werden können und keine Einzelzeitpunktbestimmung durchgeführt werden muss.

Untersuchungen von fluiden EPC/EPG und rigideren DPPC/DPPG-Liposomen (Foslip®), in deren Membran 8 mol% mTHPC eingebaut wurde, führten zu vergleichbaren Ergebnissen wie *in vitro*-Studien, die sich der SEC bedienten (Decker et al. 2013b, Kaess und Fahr 2014). Während der Lipidlabel komplett wiedergefunden werden konnte, wurden ca. 15 % des mTHPC entweder vom Cross-Flow durch die Membran ausgespült oder an die Membran gebunden. Eine vergleichbare Menge des Wirkstoffes konnte auch in den SEC-Experimenten nicht wiedergefunden werden (Decker et al. 2013b). In diesem Fall kann mTHPC an das Gel gebunden werden, von wo aus es in folgenden Versuchen auf die Probe zurücktransferieren kann.

Ein kritischer Punkt bei der Auftrennung durch die AF4 ist der Fokusschritt, in dem die Probe sehr nah am Injektionsort aufkonzentriert wird und die damit eine Verlängerung der Inkubationszeit darstellt. Studien dieser Arbeit konnten für Foslip® zeigen, dass dieser Effekt in einem Maß vorhanden ist, der die folgenden Transferbeobachtungen nicht überdeckt, aber dennoch in die jeweiligen Betrachtungen einbezogen werden muss.

Ein anderer Punkt, der zu einer limitierten Anwendbarkeit der Methode führte, waren die geringen Wiederfindungen der weniger lipophilen APIs. Kuntsche et al. konnten zeigen, dass die Wiederfindung unterschiedlicher liposomaler Wirkstoffe an der AF4 mit deren Lipophilie zusammenhängt (Kuntsche et al. 2012). Sie führten die geringen Wiederfindungen für Testosteron (11 %; $\log P = 3,3$) und Corticosteron (2 %; $\log P = 1,9$) auf die erhöhte Wirkstofffreisetzung unter der starken Verdünnung und den geschaffenen Sink-Bedingungen zurück. Obwohl die Fähigkeit einer lipophilen Substanz, sich in den anisotropen Bilayer anzureichern, von weiteren Faktoren als nur dem Octanol-Wasser-Koeffizienten abhängt

(Oliveira et al. 1989), gilt es als Faustregel, dass Substanzen mit einem log P-Wert zwischen 1,7 und 5 nur bedingt in den Bilayer fest eingeschlossen werden können und häufig in der Folge schnell wieder freigesetzt werden (Muralidharan et al. 2014). Die im Rahmen dieser Arbeit neben mTHPC untersuchten Wirkstoffe lagen ebenfalls in diesem Bereich der Lipophilie und konnten an der AF4 nur zu 7 bis 17 % wiedergefunden werden. Große Teile dieser APIs wurden durch die Membran gespült und landeten im Cross-Flow. Nicht ausgespülte Wirkstoffe zeigten eine erhöhte Affinität zu Albumin und weniger zu den phospholipid- und cholesterolreichen Lipoproteinen.

Am Langmuir-Trog konnte für diese Wirkstoffe ebenfalls ein sehr schneller Transfer an den Monolayer gemessen werden. Auch dieser Effekt kann auf eine schnelle Freisetzung in Folge der hohen Verdünnung zurückgeführt werden bzw. einer schnellen Einstellung des Gleichgewichts zwischen Bilayer, Subphase und Monolayer. Ähnlich schnelle Transferzeiten wurden in analogen Transfermodellen auch für Cyclosporin A (log P = 2,92 (El Tayar et al. 1993)) und Paclitaxel (log P = 2,5 (berechnet) (NCBI 2004-2016)) berichtet (Fahr et al. 2005). Für Cyclosporin A ist bekannt, dass es *in vivo* schnell aus den Liposomen freigesetzt wird (Fahr et al. 1995).

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass die untersuchten Wirkstoffe sich zwar in den Bilayer einarbeiten ließen, unter den gewählten Versuchsbedingungen allerdings nicht in der Membran gehalten werden konnten und in der Folge einer schnellen Freisetzung unterliegen. Ein solches Verhalten ist beispielsweise für ein passives Targeting unerwünscht. In dieser Hinsicht geben beide Methoden – Langmuir-Trog und AF4 – wichtige Informationen zum Freisetzungsverhalten unter Sink-Bedingungen für die Trägersysteme. Die Messung der Plasmaproteinbindung war jedoch nicht möglich. Die Messung des *in vitro*-Verhaltens in Abhängigkeit von der Membranzusammensetzung wurde im Folgenden nur noch für mTHPC weiterbetrachtet.

4.2 *In vitro*-Verhalten von mTHPC-Liposomen in Plasma

4.2.1 Einbau von mTHPC in den Bilayer

Nach der Injektion von Foscan® in den Blutkreislauf kann die Ausbildung von Wirkstoffaggregaten beobachtet werden. Diese Aggregate sind für die lange und atypische Pharmakokinetik und -dynamik der Formulierung verantwortlich (Senge und Brandt 2011). Für mTHPC konnten im Plasma zwei Formen beobachtet werden: Dimere, die sich vergleichsweise schnell in Monomere umwandeln und höhere Aggregate, deren Disaggregationsverhalten langsamer ist und von Albumin abhängt (Sasnouski et al. 2005). Porphyrin-Aggregate weisen eine erhöhte Lipophilie auf, was die Aufnahme in das Gewebe und den Verbleib in der Membran begünstigt (Ricchelli et al. 1998). Auf der anderen Seite zeigt

die monomere Form eine erhöhte photodynamische Leistung und ist für die Bildung der reaktiven Sauerstoffspezies verantwortlich (Senge und Brandt 2011).

Nicht nur in wässriger Lösung neigen Porphyrine zur Aggregation. Auch in biologischen Membranen (Ricchelli 1995) und Liposomen (Ricchelli et al. 1998) konnte dieses Phänomen bereits beobachtet werden. So bilden Hematoporphyrin und Protoporphyrin im hydrophilen als auch lipophilen Milieu planare Aggregate.

Reshetov et al. beobachteten mTHPC-Aggregate – sogenannte J-Aggregate – in rigiden DPPC/DPPG-Liposomen. Die Ausbildung der Aggregate war dabei abhängig von der Wirkstoffbeladung. Bei einem Einbau von 8 mol% mTHPC in die Membran konnte nur ein geringes Aggregationsverhalten gemessen werden. Bei PEGylierten Liposomen war dieser Effekt noch geringer ausgeprägt. Die Gruppe konnte ebenso zeigen, dass die PEGylierung einen Einfluss auf die Lage des Moleküls hatte. Während mTHPC in herkömmlichen Membranen im inneren der Membran lokalisiert ist, konnten bei der PEGylierten Formulierung vergleichsweise mehr Moleküle an der Membranoberfläche detektiert werden. Die Autoren begründen dieses Phänomen mit der Löslichkeit des APIs in PEG (Reshetov et al. 2011). In fluiden Membranen (z.B. nach Temperaturerhöhung) ordnet sich das Molekül noch weiter im lipophilen Teil an (Lavi et al. 2002, Reshetov et al. 2011). Polarere Photosensitizer lagern sich dagegen eher zwischen den Fettsäureketten und der Kopfgruppe an (Veres et al. 2012). Der Zusatz von Cholesterol konnte dazu beitragen, das eher polare Photofrin II näher an die Grenzfläche zur wässrigen Phase zu verschieben (Ehrenberg und Gross 1988). Im Gegensatz dazu verbleiben die lipophileren Varianten im lipophilen Bereich der Membran (Lavi et al. 2002). Kepczynski et al. schlussfolgerten, dass der dem jeweiligen Molekül zur Verfügung stehende Raum die Lage des Wirkstoffs im Bilayer beeinflusst (Kepczynski et al. 2008).

Die Messungen an der Filmwaage konnten zeigen, dass der Einbau mTHPCs in einen DPPC-Phospholipidmonolayer die Stellung des Moleküls auf der Wasseroberfläche verändern und ebenso die Aggregation des Moleküls verringern kann. Dabei zeigte mTHPC einen ähnlichen Effekt auf das Verhalten des Lipidfilms wie eine Temperaturerhöhung, die Verwendung von Phospholipiden mit ungesättigten Fettsäuren (Yun 2003) oder den Einbau von Cholesterol (Worthman et al. 1997) in einen DPPC-Film. Alle drei Ansätze sind dafür bekannt, die Fluidität einer DPPC-Membran zu erhöhen. Der beobachtete Effekt war nicht linear zur hinzugefügten Menge an mTHPC.

Decker et al. beschrieben, dass der Wirkstoff die Fluidität einer POPC/POPG-Membran erhöht. Sie bedienten sich der AF4, um die größen- und krümmungsabhängige Verteilung von mTHPC in SUVs zu bestimmen. Höhere Wirkstoffbeladungen konnten in kleineren Vesikeln gefunden werden (Decker et al. 2012). Kuntsche et al. zeigten, dass der Einbau von mTHPC in eine rigide Membran den Phasenübergang in Abhängigkeit von der mTHPC-Beladung nach

unten verschiebt. Für DPPC/DPPG-Liposomen, die einen Phasenübergang von den fluiden in den rigiden Zustand bei 42 °C haben, kann der Zusatz von mTHPC diesen sogar auf unterhalb der Körpertemperatur reduzieren. Gleichzeitig kann eine Verbreiterung des Phasenüberganges für steigende mTHPC-Beladungen beobachtet werden, was auf Interaktionen zwischen den polaren Kopfgruppen hindeuten kann. Die Lage des Phasenüberganges ist dagegen von den Kohlenstoffketten der Phospholipide abhängig (Kuntsche et al. 2010). Eine solche Interaktion ließ sich auch in den Langmuir-Untersuchungen beobachten, wodurch sich der Übergang vom flüssig-expandierten in den flüssig-kondensierten Zustand verschob und der dritte Phasenübergang komplett verschwand.

Im Gegensatz dazu konnten Dragicevic-Curic et al. beobachten, dass der Einbau des Wirkstoffs in die Membran von Invasomen deren Fluidität herabsetzte. Ihre Hypothese belegten sie mit DSC-Messungen, in denen gezeigt wurde, dass der Einbau von mTHPC den Phasenübergang von DMPC nach oben verschiebt. Als Ursache geben sie die Einschränkung der Beweglichkeit der Lipidketten durch Wirkstoff-Moleküle an. Diese Ergebnisse wurden durch ESR-Messungen unterstützt, in denen gezeigt werden konnte, dass sich das Molekül in der Nähe der Lipidketten lokalisiert (Dragicevic-Curic et al. 2011).

Diese Zusammenfassung zeigt, dass mTHPC in Abhängigkeit von der Membranzusammensetzung unterschiedliche Einflüsse auf deren Verhalten hat. Gleichzeitig bestimmt die Zusammensetzung der Formulierung die Fähigkeit, den Photosensitizer in die Membran einzubauen. Im Folgenden soll daher betrachtet werden, inwiefern eine systematische Modifikation der Membranzusammensetzung einen Einfluss auf das *in vitro*-Verhalten der Formulierung in humanem Plasma hatte.

4.2.2 Einfluss der Formulierung auf die *in vitro*-Stabilität und Wirkstofffreisetzung

Studien über die Plasmabindung von mTHPC zeigten eine hohe Affinität zu lipophilen Plasmabestandteilen wie HDL (39 %), LDL (22 %), VLDL (6 %) und dem ebenfalls lipophilen Lipoprotein(a) (17 %). Dagegen lag nur ein geringerer Teil in der Fraktion mit den löslichen Proteinen, z.B. Albumin (16 %) gebunden vor (Michael-Titus et al. 1995). Die Verteilung von Lipoprotein(a), das sich aus LDL-ähnlichen Partikeln und Apolipoprotein(a) zusammensetzt, ist im Plasma sehr heterogen und die gemessenen Molekulargewichte reichen von $2 \cdot 10^6$ bis 10^{10} Da (März et al. 1993). Im Rahmen unserer Untersuchungen konnten wir vier unterschiedliche Fraktionen identifizieren, an welche mTHPC und der Lipidlabel gebunden vorlagen: Albumin, HDL, LDL und eine Fraktion, die VLDL, Liposomen und unter Umständen auch Lipoprotein(a) enthielt. Diese Moleküle zeigen eine Überlappung in den Partikelgrößen und können dadurch nicht auf diese Weise voneinander getrennt werden. Ähnliche Beobachtungen konnten auch in SEC-Studien getätigt werden (Reshetov et al. 2012, Decker et al. 2013b, Kaess und Fahr 2014). Unsere Versuche mit einer ethanolischen Lösung von

mTHPC zeigten, dass dieses nach der Auftrennung nahezu dosisunabhängig zu ca. 75 % an HDL gebunden vorlag, während ca. 16 % in den LDL- und 5 % in den Albuminfraktionen wiedergefunden werden konnten. Die Verteilung auf größere Partikel – beispielsweise VLDL und Lipoprotein(a) – spielten in diesem Aufbau unter Verwendung von Plasma, das im nüchternen Zustand gewonnen wurde, nur eine geringere Rolle. Ähnliche Verteilungen konnten für liposomales mTHPC erzielt werden. Auch in diesem Fall stellte HDL den Hauptakzeptor dar (Holzschuh et al. 2015). Interessanterweise blieb der Anteil an mTHPC, der an Albumin gebunden war, über den kompletten Inkubationszeitraum weitestgehend unverändert. Es stellt sich die Frage, ob es sich in diesem Fall um eine Nebenkompone – z.B. ein Photoprodukt – handelt, das bei der Herstellung und Probenvorbereitung entstanden ist und eine hohe Affinität zu diesem Protein besitzt. Einen ähnlichen Effekt haben wir bereits für Phospholipide beschrieben, bei der die durch Hydrolyse entstandene Fettsäure vermehrt an Albumin bindet (Holzschuh et al. 2015).

Das Verteilungsverhältnis des Wirkstoffes auf die Plasmakomponenten blieb weitestgehend von der Zusammensetzung der Formulierung unbeeinflusst. Lediglich das Ausmaß und die Geschwindigkeit, mit der der Wirkstoff auf diese Fraktionen transferiert wurde, und die Vesikelstabilität waren von der Membranzusammensetzung abhängig (Veröffentlichung 3).

In unseren Untersuchungen zeigte sich, dass neben der separaten Beobachtung von Vesikelstabilität und Wirkstofftransfer auch das Verhältnis von API zu Lipid in der Liposomenfraktion wichtig für das Verständnis der mTHPC-Freisetzung ist. Dieser Quotient erlaubt zwischen zwei Mechanismen der Wirkstofffreisetzung – Instabilität der Vesikel oder direkter Austausch aus der Membran – zu unterscheiden. Auf diesem Weg kann exakter beschrieben werden, inwiefern eine Membran in der Lage ist, ein Molekül aufzunehmen und wie hoch das Bestreben ist, dieses wieder abzugeben. Dieser Quotient wurde bereits zuvor von Decker et al. beschrieben und angewandt (Decker et al. 2013b).

4.2.2.1 Membranfluidität und Beladung

Einen entscheidenden Parameter in diesen Betrachtungen stellte die Fluidität der Membran dar. In einem ersten Ansatz wurden daher EPC/EPG-Liposomen und DPPC/DPPG-Liposomen mit gleicher Temoporfinbeladung untersucht. Hierbei konnte in Übereinstimmung mit der Literatur beobachtet werden, dass die rigidere Formulierung in Plasma eine hohe Stabilität über den kompletten Inkubationszeitraum aufwies. Nachdem in den ersten 30 min nur eine geringe Vesikeldestruktion stattfand (Decker et al. 2013b), verringerte sich der Abbau über die folgenden 48 Stunden deutlich. EPC/EPG-Liposomen wurden deutlich und kontinuierlich über den kompletten Versuchszeitraum abgebaut. Ursache hierfür ist der bereits erwähnte Phospholipidaustausch über PLTP. Andererseits wurde mTHPC aus der rigidere Membran schneller freigesetzt. Lavi et al. beschrieben, dass lipophile Porphyrine durch den

Platzmangel in solchen Membranen an die Oberfläche gedrückt werden (Lavi et al. 2002). Durch diese Lokalisation können sie leichter über Kollision und Diffusion ausgetauscht werden. Eine Verringerung der Beladung sorgte dafür, dass die EPC/EPG-Liposomen den Wirkstoff nahezu ausschließlich über Vesikelinstabilität freigaben. Die Reduktion der Wirkstoffbeladung der DPPC/DPPG-Liposomen sorgt für eine Änderung von T_C (Kuntsche et al. 2010). Während bei der Formulierung, die 8 mol% enthielt, oberhalb von T_C gearbeitet wurde, lag bei einer Temoporfinbeladung < 3 mol% der Übergang oberhalb der Versuchsbedingungen. Trotzdem konnte kein Unterschied in der Vesikelstabilität beobachtet werden. Der prozentuale mTHPC-Transfer aus der Gelphase konnte ebenfalls durch Reduktion der Beladung vermindert werden, der Wirkstoff wurde aber dennoch zu einem Großteil freigesetzt. Beobachtet man das Wirkstoff-Lipid-Verhältnis in der Membran über die Zeit, lässt sich für Foslip – bedingt durch eine Art von Burst-Release – eine Halbwertszeit von ca. 30-60 Minuten ablesen und wurde mithilfe des angewandten Modells auf 0,93 h beziffert. Dieser Wert korreliert sehr gut mit erhobenen *in vivo*-Daten (Reshetov et al. 2013).

Cholesterol

Eine Möglichkeit, die Rigidität fluider Vesikel zu erhöhen, stellt der Einbau von Cholesterol in die Membran dar. In unseren Studien konnte analog zur Literatur gezeigt werden, dass die Stabilität der Formulierung in Abhängigkeit von der – dem Bilayer zugeführten – Menge Cholesterol zunahm (Allen 1981, Damen et al. 1981, Sulkowski et al. 2005). Ebenso konnte ein kondensierender Effekt beobachtet werden. Durch die dichtere Packung der Phospholipidmoleküle wurde es dem CETP erschwert, die Membran zu penetrieren. In der Folge trat ein verzögerter COE-Transfer auf, der durch Torcetrapib inhibiert werden konnte. Studien mit einem markierten Cholesterollabbel konnten zeigen, dass dieser langsam über die Zeit austauscht (Fahr und Seelig 2001). Dies begründet auch eine verstärkte Abnahme der Vesikelintegrität für längere Inkubationszeiträume.

Gleichzeitig konnte beobachtet werden, dass der Zusatz von Cholesterol die Wirkstofffreigabe von mTHPC aus der Membran beschleunigte und erhöhte. Decker et al. berichteten, dass mTHPC eine geringere Affinität zu cholesterolhaltigen Membranen zeigt. Dies erklärt auch die höhere Affinität zu HDL, das im Vergleich zu LDL einen höheren Phospholipidanteil und einen geringeren Cholesterolanteil aufweist (Decker et al. 2013b). Antunes-Madeira und Madeira beschreiben für Parathion, dass eine verringerte Fähigkeit, den Wirkstoff nach Einbau von Cholesterol in der Membran zu halten, mit der Konkurrenz um Bindungsplätze oder durch Neuordnung der Lipidketten begründet werden kann (Antunes-Madeira und Madeira 1984). Ali und Kirby beobachteten für Propofol-, Diazepam-, Ibuprofen- und Midazolam-Liposomen, dass die jeweilige Beladungseffizienz ebenfalls durch den Einbau von Cholesterol in die Membran verringert wird. Im Falle von Propofol wurde dadurch die Wirkstofffreisetzung verlangsamt. Die

Messung fand allerdings in Phosphatpuffer statt, in dem lipophile Akzeptoren fehlen (Ali et al. 2010). Diese stellen offensichtlich eine Voraussetzung für die schnelle Freisetzung dar.

Einfluss von Doppelbindungen und Kettenlänge

Eine andere Möglichkeit, die Fluidität einer Membran zu erhöhen, ist die Einführung von Doppelbindungen oder die Variation der Kettenlänge. Aus diesem Grund wurden Phospholipide mit gesättigten (DPPC/DPPG), einer ungesättigten (POPC/POPG) oder zwei ungesättigten (DOPC/DOPG) Fettsäureketten als Membranbausteine untersucht. Eine POPC/POPG-Membran zeigte dabei ähnliche Fähigkeiten wie eine analoge EPC/EPG-Formulierung, das mTHPC in der Membran zu halten. In einem anderen Versuch wurden Phospholipide mit gesättigten Fettsäureketten verwendet, deren Kettenlänge variiert (DMPC/DMPG, DPPC/DPPG, DSPC/DSPG). Die entsprechenden Formulierungen zeigten keine bzw. nur geringe Interaktionen mit CETP und ihre Stabilität nahm mit Zunahme der Kettenlänge zu. Die kurzkettigen DMPC/DMPG-Vesikel zeigten eine ähnliche Fähigkeit, den Wirkstoff in der Membran aufzunehmen wie DPPC/DPPG-Liposomen und setzten diesen in einer ähnlichen Geschwindigkeit frei. Decker et al. konnten dies in *in vivo*-Studien ebenfalls beobachten (Decker et al. 2013a). Gleichzeitig war der Transfer aus den langkettigen DSPC/DSPG-Liposomen verlangsamt. Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu Beobachtungen von Hefesha et al., die eine Zunahme der Transfargeschwindigkeit von mTHPC mit steigender Kettenlänge der Donorliposomen beschrieben (Hefesha et al. 2011). Sie verwendeten für ihre Untersuchungen allerdings mTHPC-Liposomen, die eine deutlich geringere Beladung aufwiesen. DMPC/DMPG und DPPC/DPPG-Liposomen mit einer Beladung von 8 mol% liegen bei 37°C oberhalb von T_C vor. Unter den von Hefesha gewählten Bedingungen trifft dies nur für die DMPC/DMPG-Formulierung zu (Kuntsche et al. 2010). Gleichzeitig bedingt eine erhöhte Beladung eine verstärkte Aggregation des mTHPCs in der Membran (Reshetov et al. 2011), welche die Freisetzung verlangsamen kann. DSPC/DSPG-Liposomen weisen unter den untersuchten Formulierungen die dichteste Lipidpackung auf (Yun 2003) und bieten dem Photosensitizer den geringsten Platz in der Membran. Anhand der gemessenen Daten kann davon ausgegangen werden, dass sich in Folge des Platzmangels in dieser Membran verstärkt Aggregate bilden (Postigo et al. 2004), die sich erst auflösen, wenn die vorliegenden Monomere freigesetzt wurden. Solche Formulierungen zeigten eine entsprechend langsame zweite Freisetzungsphase. Diese Überlegungen werden durch unser Modell gestützt (Veröffentlichung 3).

4.2.2.2 PEGylierung der Oberfläche

Eine PEGylierung der Liposomenoberfläche erhöht die Stabilität im humanen Plasma *in vitro* und *in vivo* während der Zirkulation. Decker et al. und Reshetov et al. beschrieben, dass eine PEGylierung von Foslip zu einer beschleunigten mTHPC-Freisetzung führt und begründen dies mit der Löslichkeit des Wirkstoffes in der PEG-Hülle und einer Ausbildung von Mizellen, die als Transporter auftreten können (Reshetov et al. 2012, Decker et al. 2013a). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass dieser Effekt durch eine Erhöhung der Packungsdichte und Verlängerung der PEG-Ketten ausgeprägter beobachtet werden kann und auch auf eine EPC/EPG-Formulierung übertragbar ist.

In vivo-Studien belegen, dass mit Fospeg® dennoch höhere Plasmaspiegel an liposomalem mTHPC erzielt werden können. Der schnelleren Wirkstofffreigabe über die PEG-Ketten stand die in diesem Fall die erhöhte Stabilität der PEGylierten Form gegenüber, deren Abbau durch das MPS durch die schützende PEG-Schicht behindert wird (Reshetov et al. 2013). Xie et al. beobachteten ebenfalls für Fospeg® höhere Plasmaspiegel, längere Zirkulationszeiten und ein verbessertes Haut-Tumor-Verhältnis als für Foslip®. Sie verwendeten eine HPLC-Methode, um die Wirkstoffkonzentration nach parenteraler Applikation zu bestimmen (Xie et al. 2015).

4.2.3 Zusammenfassung

Bei der im Rahmen der PDT eingesetzten Substanzklasse der Porphyrine handelt es sich in der Regel um lipophile Substanzen, die in wässriger Lösung zur Aggregation neigen. Liposomale Trägersysteme stellen eine Möglichkeit dar, diese Erscheinung zu verringern und den Wirkstoff im Bilayer aufzunehmen. Für Temoporfin gelang dies in der vorliegenden Arbeit zu 12 mol%. Dieses Prinzip wird in der Praxis auch erfolgreich bei einem anderen Photosensitizer – Verteporfin – zur Therapie der altersbedingten Makuladegeneration angewandt. In Visudyne® lässt sich Verteporfin in einem Wirkstoff-Lipid-Verhältnis von 1 zu 7,5 bis 15 in eine EPC/DMPC-Membran einbauen (Fahr et al. 2005). *In vitro*-Transferuntersuchungen zwischen Phospholipidvesikeln und Plasmaproteinen zeigten, dass dieser Wirkstoff sehr schnell auf die entsprechenden Akzeptoren transferiert werden konnte und sich innerhalb weniger Minuten ein Gleichgewicht einstellte. Die fluide Formulierung zeigte zusätzlich Instabilität gegenüber Plasmazugabe. Verteporfin bindet ebenso wie mTHPC bevorzugt an Lipoproteine (Chowdhary et al. 2003). Das Molekül zählt zu den polaren Porphyrinen und lagert sich im Bilayer in der Nähe der polaren Kopfgruppe an (Tekrony et al. 2011). Diese Position erleichtert in Kombination mit einem vergleichsweise geringen log P von 2,1 (gemessen) bzw. 4,9 (berechnet mit XLOGP 3) (NCBI 2004-2016) den Austausch durch Diffusion und Kollision mit einer anderen Membran. Die Wahl einer in Plasma instabilen Formulierung beschleunigt zusätzlich die Freisetzung. Eine andere Membranzusammensetzung, die die Stabilität gegenüber Plasmabestandteilen erhöht, könnte

daher die Pharmakokinetik verbessern (Chang und Yeh 2012). mTHPC zeigte – trotz seiner deutlich höheren Lipophilie und seiner Position in der Nähe der Lipidketten – ebenso einen unerwartet schnellen Transfer in Gegenwart von Plasmaproteinen. In diesem Fall konnte die Wahl der Lipide nicht nur die Stabilität der Formulierung, sondern auch die Fähigkeit, die Wirkstoffmoleküle in der Membran zu halten beeinflussen. Vesikel, die aus Lipiden mit ungesättigten Fettsäuren zusammengesetzt waren, konnten mTHPC besser in die Membran aufnehmen und waren weniger bestrebt, den API wieder freizugeben. Eine solche Membran findet auch in Visudyne® Anwendung. Rigide Bilayer neigen dazu, mTHPC in Richtung der Oberfläche zu drücken, von wo aus das Molekül schnell an lipophile Akzeptoren transferiert werden kann. Aus diesem Grund konnten mit der fluiden Formulierung in den präsentierten *in vitro*-Untersuchungen – trotz geringerer Stabilität – höhere Plasmaspiegel an liposomalem mTHPC erzielt werden. PEGylierung der Oberfläche und Einbau von Cholesterol sind neben der Wahl rigider Lipide weitere Möglichkeiten, die Stabilität einer Formulierung zu erhöhen. Cholesterol erwies sich dabei als kontraproduktiv, was den Einbau von mTHPC in den Bilayer betraf, da beide Moleküle um eine Position in der Membran konkurrieren. Auch eine PEGylierung erhöht die Wirkstofffreigabe. Jedoch überwiegt in diesem Fall die Erhöhung der Stabilität gegenüber Plasmaproteinen, sodass *in vivo* höhere Plasmaspiegel an liposomalem Wirkstoff gemessen werden konnten (Reshetov et al. 2013, Xie et al. 2015).

Die Versuche am Langmuir-Trog unterstützen die These, dass eine Phospholipidmembran einen geeigneten Träger für mTHPC darstellt. Der Wirkstoff ließ sich sehr gut in den Monolayer einbauen, wodurch sich seine Eigenschaften auf einer wässrigen Subphase veränderten. Die Eigenschaften des mTHPC-Phospholipid-Systems waren dabei von dessen Zusammensetzung abhängig. In den folgenden Versuchen konnte gezeigt werden, dass mTHPC im Vergleich zu weniger lipophilen Wirkstoffen langsamer aus Liposomen an den Monolayer transferiert wird, was voraussichtlich auf die verlangsamte Wirkstofffreisetzung in die wässrige Subphase zurückzuführen ist. Dass dies dennoch deutlich schneller geschah als bei Cholesterol bestätigt die Vermutung, dass sich ein Teil des Wirkstoffes nahe der Vesikeloberfläche lokalisiert.

Wie eingangs erwähnt, existiert keine Universalformulierung, die für jeden Wirkstoff ein adäquates Pharmakokinetikprofil liefert. Vielmehr sollte in einem ersten Schritt das gewünschte Profil definiert werden und anschließend die Formulierung entsprechend der Zielstellung entwickelt werden. Während bei hydrophilen Wirkstoffen der Fokus „lediglich“ auf der gewünschten Membranstabilität und der Löslichkeit des APIs liegt, konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass sich bei lipophilen APIs zusätzlich die Aufgabe stellt, den Bilayer so zu gestalten, dass er in der Lage ist, den Wirkstoff aufzunehmen und kontrolliert – den Anforderungen entsprechend – wieder freizusetzen.

4.3 Ausblick

In den vergangenen Jahren hat sich eine Reihe an liposomalen Produkten auf dem pharmazeutischen Markt etabliert. Eine Vielzahl an Publikationen, die sich mit der Herstellung, physikochemischen Charakterisierung sowie dem *in vitro*- und *in vivo*-Verhalten beschäftigen oder neue Strategien des Wirkstofftransports und der –freisetzung beschreiben, leisteten seit den 60er Jahren einen großen Beitrag zur Entwicklung dieses Wirkstoffträgersystems. Obwohl die Vorteile – z.B. hohe Biokompatibilität, Beeinflussung des Membranverhaltens, gewebespezifische Therapiemöglichkeit oder gerichtete Freisetzungsmechanismen – bekannt sind, bleiben andere Fragen, die für das Verständnis notwendig sind, heute noch unbeantwortet. Die hohe Komplexität der Systeme erfordert in der Regel eine individuelle Formulierungsgestaltung und kann die industriellen Entwickler aufgrund von hohen Kosten und Zeitaufwänden zurückschrecken.

In den präsentierten Studien wurde mit der AF4 eine Methode etabliert, die zum systematischen Screening des *in vitro*-Verhaltens von unterschiedlichen mTHPC-Liposomenformulierungen in humanem Plasma verwendet wurde. Diese Methode ist im Vergleich zu anderen etablierten Verfahren einfach in der Handhabung und erzielt eine schnelle und saubere Auftrennung des kolloidalen Gemisches. Durch die simultane Bestimmung der Lipid- und Wirkstoffverteilung mithilfe von Radioaktivitätsmarkern konnten Mechanismen der Wirkstofffreisetzung und des Vesikelabbaus durch Plasmaproteine untersucht werden und in Abhängigkeit von der Formulierungszusammensetzung beschrieben und quantifiziert werden. Die gewonnenen Erkenntnisse wurden anhand eines Modells analysiert und durch begleitende Messungen an der Filmwaage unterlegt.

„So eine Arbeit wird eigentlich nie fertig, man muß sie für fertig erklären, wenn man nach Zeit und Umständen das möglichste getan hat.“

(Johann Wolfgang von Goethe)

Die beschriebenen Studien können in verschiedenen Bereichen ergänzt werden. Die Untersuchungen an der Filmwaage bilden nur einen Ansatz, wie man anhand eines Monolayers das Verhalten einer Liposomenmembran darstellen kann. Interessant wäre in diesem Fall beispielsweise, welchen Einfluss Cholesterol oder die Verwendung PEGylierter Lipide auf das Packungsverhalten der Lipide – und im Speziellen einer Lipid-Wirkstoff-Mischung – hat. In diesem Zusammenhang wäre es denkbar, das Verhalten weiterer Wirkstoffe in einem Monolayer zu untersuchen, um Aussagen über deren Einfluss auf eine Lipidmembran treffen zu können. Durch Verwendung eines Mikroskops (z.B. ein Brewster-Winkel-Mikroskop), das auf die Oberfläche gerichtet ist, könnten ebenfalls zusätzliche Informationen generiert werden. Ein interessanter Ansatz wäre auch, den Wirkstofftransfer aus

dem Monolayer auf einen lipophilen Akzeptor in der hydrophilen Phase (z.B. unbeladene Liposomen) zu untersuchen.

Im Rahmen der Inkubationsversuche wäre es sinnvoll, den Einfluss der Temperatur auf das Transferverhalten zu untersuchen. Dies ist besonders für die Formulierungen interessant, die ihren Phasenübergang in der Nähe von 37 °C besitzen. Ein anderer Parameter, der einen Einfluss auf das *in vivo*-Verhalten hat, ist die Ladung der Oberfläche. Für diesen Fall wäre eine Modifikation der AF4 notwendig, damit die Vesikel nicht an die üblicherweise negativ geladene Membran absorbieren. Eine Modifikation der Methode kann auch in Hinblick auf Verkürzung der Laufzeit und Verringerung der Cross-Flow Bedingungen interessant sein. In diesem Fall würde es zu einer geringeren Verdünnung der Probe kommen, sodass die Chance, auch hydrophilere Substanzen zu detektieren, erhöht werden würde. Ein letzter Punkt, der Beachtung finden könnte, ist die Größe der Liposomen.

5 Zusammenfassung

Die moderne Arzneimittelentwicklung ist in der Lage, eine Vielzahl hochpotenter Wirkstoffe zu entwickeln. Ein großer Teil dieser Substanzen weist jedoch schlechte biopharmazeutische Eigenschaften auf, die eine erfolgreiche Therapie erschweren oder gar verhindern. Beispielsweise besitzen ca. 40 % der zugelassenen Wirkstoffe und 90 % der chemischen Entwicklungskandidaten eine schlechte bis sehr schlechte Löslichkeit in wässrigen Medien. Die Verwendung von Arzneistoffträgersystemen stellt eine Möglichkeit dar, dieses Problem zu umgehen. Dabei kann der Wirkstoff in verkapselter Form vorliegen, in den Träger eingebaut werden oder an Bestandteile des Systems adsorbieren.

Liposomen sind ein bereits in der Praxis etablierter Ansatz, der in verschiedenen Marktprodukten Anwendung findet. Diese kugelförmigen Vesikel bestehen aus einem oder mehreren Bilayern aus Phospholipiden, die jeweils eine wässrige innere Phase umschließen. In dieser kann ein hydrophiler Wirkstoff gelöst und vor dem äußeren Milieu (z.B. Plasmaproteine) geschützt transportiert werden. Durch Ausnutzen eines passiven Targetings über den sogenannten EPR-Effektes ist es auf diesem Weg beispielsweise möglich, den Wirkstoff im Tumorgewebe zu akkumulieren und dadurch die Dosis und Nebenwirkungen im Vergleich zu einer konventionellen Therapie (z.B. Tablette oder Lösung) zu verringern. Lipophile und amphiphile Wirkstoffe können direkt in den Bilayer der Vesikel eingebaut werden. Im Gegensatz zu der hydrophilen Phase steht dieser jedoch nach der Injektion in stetigem Kontakt mit Membranen oder Blutbestandteilen. Da diese Strukturen ebenfalls über lipophile Bindungsstellen verfügen, können Bestandteile der Liposomenmembran, darunter auch der Wirkstoff, ausgetauscht und auf diese Weise freigesetzt werden.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit diesen Transfererscheinungen, indem sie die Freisetzung eines lipophilen Wirkstoffes aus der Liposomenmembran untersucht. Im ersten Teil liegt der Fokus auf der zeitabhängigen *in vitro*-Interaktion mit humanen Plasmaproteinen. Hierfür wurde an der AF4 eine Methode entwickelt, die eine bei 37 °C inkubierte Liposomen-Plasma-Mischung innerhalb von 90 Minuten in die für den Transfer relevanten Fraktionen – Albumin, HDL, LDL und Vesikel – fraktioniert. Die Messung der Wirkstofffreisetzung erfolgte über eine radioaktive Markierung. Zeitgleich wurde die Stabilität der Vesikel untersucht, in dem die zeitabhängige Verteilung eines entsprechenden radioaktiven, lipophilen Markers gemessen wurde. Zur Anwendung kamen hierfür Cholesterololeylether (COE) und unterschiedliche DPPC-Label. Ersterer ist metabolisch stabil und tauscht nach Angaben in der Literatur nur sehr langsam aus. Die durchgeführten Untersuchungen in humanem Plasma zeigten jedoch, dass COE Substrat des Cholesterol-Transferproteins (CETP) ist. Die Kinetik dieses Transfers wurde durch die Zusammensetzung der Membran gesteuert. Fluide

Membranen beschleunigten den Austausch, wohingegen eine Retardierung bei einer zunehmenden Steifigkeit oder einer sterischen Oberflächenmodifikation beobachtet werden konnte. Die Verwendung des CETP-Inhibitors Torcetrapib konnte den aktiven Transfer mit Ausnahme einer DOPC-DOPG-Membran auf ein Minimum reduzieren. DPPC dagegen ist ein Substrat des Phospholipidtransferproteins (PLTP) und unterliegt einer Hydrolyse. Diese Faktoren schränken die Anwendbarkeit dieses Labels für solche Untersuchungen ein. Die Stabilität der Liposomen war abhängig von der Lipidzusammensetzung. Mit steigender Rigidität, durch den Einbau von Cholesterol oder durch PEGylierung der Oberfläche konnte sie erhöht werden.

Die Wirkstofffreisetzung der lipophilen Modellschubstanz Temoporfin (mTHPC) war ebenfalls abhängig von der Lipidzusammensetzung. Rigid Membranen sind schlechter in der Lage, dieses Molekül einzubauen, weswegen für diese Formulierungen eine schnellere Freisetzung beobachtet werden konnte. Selbiges konnte beobachtet werden, wenn die Oberfläche PEGyliert oder Cholesterol in den Bilayer eingebaut wurde. DMPC/DMPG-Liposomen erwiesen sich ebenfalls als besonders schnell freisetzend. In diesem Fall trug eine geringe Plasmastabilität der Vesikel dazu bei, dass größere Anteile des Wirkstoffes an die Lipoproteine gebunden wurden. Eine Verringerung der Wirkstoffbeladung führte zur Retardierung der Wirkstofffreisetzung. Diese Effekte wurden in einem mathematischen Modell beschrieben.

Im zweiten Teil wurde an der Langmuir-Filmwaage eine weitere Methode angewandt, mit der der Transfer des Wirkstoffes an eine Modellmembran – einem POPC-Monolayer – untersucht werden sollte. Dabei konnte festgestellt werden, dass mTHPC innerhalb weniger Minuten zwischen den Membranen austauscht. Selbiges Phänomen konnte noch schneller für weitere, weniger lipophile Wirkstoffe beobachtet werden. Liposomale Formulierungen dieser Wirkstoffe wurden ebenfalls an der AF4 auf ihr Verhalten in humanem Plasma untersucht. Hier wurde festgestellt, dass große Teile der APIs während der Auftrennung durch den Cross-Flow ausgespült wurden. Die Beobachtungen legen die Vermutung nahe, dass die Substanzen unter Sink-Bedingungen schnell aus den Bilayern freigesetzt werden können. Im Gegensatz dazu wurden für den Transfer von Cholesterol Halbwertszeiten über einer Stunde gemessen.

Zusätzlich wurde diese Methode dazu verwendet, Isothermen gemischter mTHPC-Phospholipidmonolayer zu untersuchen. Es konnte beobachtet werden, dass der Einbau des Wirkstoffes die Eigenschaften der Lipidschicht dahingehend verändert, dass die Lipidketten schlechter aufgrund erhöhter Beweglichkeit schlechter komprimieren lassen.

6 Summary

In recent years modern drug discovery techniques have given rise to a variety of highly potent drugs. However, many of these active ingredients suffer from poor biopharmaceutical properties, which impede or even prevent successful treatment. For instance, about 40% of the approved drugs and 90% of candidates in drug development show a poor to very poor solubility in aqueous media. Use of a drug delivery system provides a possibility to circumvent this problem. In drug delivery systems, the active ingredient may be present in an encapsulated form, incorporated into a carrier or adsorbed to various components of the system.

Liposomes are an established approach which form the basis of various marketed products already in practical use. Liposomes are spherical vesicles which consist of one or more phospholipid bilayers, each enclosing an internal aqueous phase in which a hydrophilic drug can be dissolved and transported protected against the external environment (e.g. plasma proteins). By utilizing a passive targeting via the so-called EPR effect, it is possible to accumulate the active ingredient for example in the tumor tissue and thereby reduce the drug dose and side effects in comparison to conventional therapy (e.g. tablet or solution). Lipophilic and amphiphilic active compounds can be directly incorporated into the vesicle bilayer. Unlike the hydrophilic phase, membrane bound drugs are in constant contact with membranes or blood components after injection. Since these structures also have lipophilic binding sites, components of the liposome membrane, including the active ingredient, can be exchanged and released in this way.

The present work deals with these transfer phenomena, as it examined the release of a lipophilic drug from the liposome membrane. In the first part, the focus was on the time-dependent *in vitro*-interaction with human plasma proteins. Therefore, a method was developed employing Asymmetrical Flow Field-Flow Fractionation (AF4) technology to fractionize the liposome-plasma mixture, within 90 minutes, into the relevant transfer fractions - albumin, HDL, LDL and vesicles, after incubation at 37°C for various time points. The drug release was measured using a radioactive label. At the same time the stability of the vesicles was examined by measuring the time-dependent distribution of a corresponding radioactive lipophilic marker. For this, cholesteryl oleyl ether (COE) and different DPPC-labels were applied. The former is metabolically stable and exchanges, according to the literature, only very slowly. However, the investigations carried out in human plasma showed that COE is substrate of cholesteryl ester transfer protein (CETP). The kinetics of this transfer were dependent on the composition of the liposome membrane. Fluid membranes accelerated the exchange, whereas a retardation was observed for an increased rigidity or a steric surface modification. The use of the CETP-inhibitor torcetrapib was able to reduce the active transfer

to a minimum, except for DOPC/DOPG liposomes. DPPC is a substrate of Phospholipidtransferproteins (PLTP) and tends to hydrolysis. These factors limit the applicability of this label for such kind of investigations. The stability of the liposomes was dependent on the lipid composition. It was increased with increasing rigidity, by the incorporation of cholesterol or by PEGylation of the surface.

Release of the lipophilic model drug temoporfin (mTHPC) was also dependent on the composition of liposomes. Rigid membranes were able to incorporate less amounts of this molecule and a faster release was observed for these formulations. The same could be seen when the surface was PEGylated or when cholesterol was incorporated in the bilayer. DMPC /DMPG liposomes showed a particularly fast release. In this case, large proportions of the mTHPC were bound to lipoproteins due to an additional low plasma stability. A reduced drug loading resulted in the retardation of drug release. All these effects were described in a mathematical model.

In the second part, Langmuir film-balance was applied as an additional method to measure the transfer of a lipophilic drug to a model membrane. Here, this model membrane was formed by a phospholipid monolayer (POPC). It could be observed that liposomal mTHPC exchanged within minutes between the membranes. The same phenomenon was observed even faster for other, less lipophilic active ingredients. Liposomal formulations of these drugs were also examined using AF4 to study their behavior in human plasma. Here, it was found that large parts of the drugs were washed out by the cross-flow during the separation. The observations suggest that these substances may be released quickly from the bilayers under sink conditions. In contrast, half times of more than one hour were measured for the transfer of cholesterol from liposomal membrane to the monolayer.

In addition, Langmuir-film-balance was applied to investigate isotherms of mixed mTHPC-phospholipid monolayers. It was observed that the incorporation of the drug changed the properties of the lipid monolayer. Probably, phospholipid molecules could get less compressed due to increased mobility of the lipid chains.

Literaturverzeichnis

Abraham, S. A., Waterhouse, D. N., Mayer, L. D., Cullis, P. R., Madden, T. D. and Bally, M. B. (2005). "The Liposomal Formulation of Doxorubicin." Methods Enzymol 391: 71-97.

Akbarzadeh, A., Rezaei-Sadabady, R., Davaran, S., Joo, S. W., Zarghami, N., Hanifehpour, Y., Samiei, M., Kouhi, M. and Nejati-Koshki, K. (2013). "Liposome: Classification, Preparation, and Applications." Nanoscale Res Lett 8(1): 102.

Ali, M. H., Kirby, D. J., Mohammed, A. R. and Perrie, Y. (2010). "Solubilisation of Drugs within Liposomal Bilayers: Alternatives to Cholesterol as a Membrane Stabilising Agent." Journal of Pharmacy and Pharmacology 62(11): 1646-1655.

Allen, T. M. (1981). "A Study of Phospholipid Interactions between High-Density Lipoproteins and Small Unilamellar Vesicles." Biochimica Et Biophysica Acta 640(2): 385-397.

Allen, T. M. and Cleland, L. G. (1980). "Serum-Induced Leakage of Liposome Contents." Biochim Biophys Acta 597(2): 418-426.

Allen, T. M. and Cullis, P. R. (2013). "Liposomal Drug Delivery Systems: From Concept to Clinical Applications." Adv Drug Deliv Rev 65(1): 36-48.

Allen, T. M. and Hansen, C. (1991). "Pharmacokinetics of Stealth Versus Conventional Liposomes: Effect of Dose." Biochim Biophys Acta 1068(2): 133-141.

Allen, T. M., Hansen, C., Martin, F., Redemann, C. and Yau-Young, A. (1991). "Liposomes Containing Synthetic Lipid Derivatives of Poly(Ethylene Glycol) Show Prolonged Circulation Half-Lives in Vivo." Biochim Biophys Acta 1066(1): 29-36.

Allen, T. M., Hansen, C. B. and Guo, L. S. (1993). "Subcutaneous Administration of Liposomes: A Comparison with the Intravenous and Intraperitoneal Routes of Injection." Biochim Biophys Acta 1150(1): 9-16.

Allen, T. M., Murray, L., MacKeigan, S. and Shah, M. (1984). "Chronic Liposome Administration in Mice: Effects on Reticuloendothelial Function and Tissue Distribution." J Pharmacol Exp Ther 229(1): 267-275.

Amidon, G. L., Lennernas, H., Shah, V. P. and Crison, J. R. (1995). "A Theoretical Basis for a Biopharmaceutic Drug Classification: The Correlation of in Vitro Drug Product Dissolution and in Vivo Bioavailability." Pharm Res 12(3): 413-420.

Antunes-Madeira, M. C. and Madeira, V. M. C. (1984). "Partition of Parathion in Synthetic and Native Membranes." Biochimica Et Biophysica Acta 778(1): 49-56.

Aron, L., Jones, S. and Fielding, C. J. (1978). "Human Plasma Lecithin-Cholesterol Acyltransferase. Characterization of Cofactor-Dependent Phospholipase Activity." J Biol Chem 253(20): 7220-7226.

Bally, M. B., Nayar, R., Masin, D., Hope, M. J., Cullis, P. R. and Mayer, L. D. (1990). "Liposomes with Entrapped Doxorubicin Exhibit Extended Blood Residence Times." Biochim Biophys Acta 1023(1): 133-139.

Bangham, A. D. and Horne, R. W. (1964). "Negative Staining of Phospholipids and Their Structural Modification by Surface-Active Agents as Observed in the Electron Microscope." J Mol Biol 8: 660-668.

Bangham, A. D., Standish, M. M. and Watkins, J. C. (1965a). "Diffusion of Univalent Ions across the Lamellae of Swollen Phospholipids." J Mol Biol 13(1): 238-252.

Bangham, A. D., Standish, M. M. and Weissmann, G. (1965b). "The Action of Steroids and Streptolysin S on the Permeability of Phospholipid Structures to Cations." J Mol Biol 13(1): 253-259.

Beisswanger, G. (1991). "Das Portrait: Agnes Pockels (1862-1935) Und Die Oberflächenchemie." Chemie in unserer Zeit 25(2): 5.

Benoit, H. C. (1996). "A Universal Calibration for Gel Permeation Chromatography - Reflections." Journal of Polymer Science Part B-Polymer Physics 34(10): 1703-1704.

Berek, D. (2010). "Size Exclusion Chromatography--a Blessing and a Curse of Science and Technology of Synthetic Polymers." J Sep Sci 33(3): 315-335.

Berg, J. M. T., J.L.; Stryer, L. (2002). Section 12.3, There Are Three Common Types of Membrane Lipids. Biochemistry. 5th Edition. W. H. Freeman. New York.

Biolin Scientific. (2016). "History of Langmuir and Langmuir-Blodgett Films." Retrieved 10.01.2016, from <http://www.biolinscientific.com/ksvnima/applications/?card=KA10>,

Blume, G. and Cevc, G. (1993). "Molecular Mechanism of the Lipid Vesicle Longevity in Vivo." Biochim Biophys Acta 1146(2): 157-168.

Bonnett, R., White, R. D., Winfield, U. J. and Berenbaum, M. C. (1989). "Hydroporphyrins of the Meso-Tetra(Hydroxyphenyl)Porphyrin Series as Tumour Photosensitizers." Biochem J 261(1): 277-280.

Bovier, P. A. (2008). "Epaxal: A Virosomal Vaccine to Prevent Hepatitis a Infection." Expert Rev Vaccines 7(8): 1141-1150.

Bovis, M. J., Woodhams, J. H., Loizidou, M., Scheglmann, D., Bown, S. G. and Macrobert, A. J. (2012). "Improved in Vivo Delivery of M-Thpc Via Pegylated Liposomes for Use in Photodynamic Therapy." J Control Release 157(2): 196-205.

Bowey, K., Tanguay, J. F. and Tabrizian, M. (2014). "2-Dioleoyl-Sn-Glycero-3-Phosphocholine-Based Nanoliposomes as an Effective Delivery Platform for 17 β -Estradiol." Eur J Pharm Biopharm 86(3): 369-375.

Buchholz, J., Kaser-Hotz, B., Khan, T., Rohrer Bley, C., Melzer, K., Schwendener, R. A., Roos, M. and Walt, H. (2005). "Optimizing Photodynamic Therapy: In Vivo Pharmacokinetics of Liposomal Meta-(Tetrahydroxyphenyl)Chlorin in Feline Squamous Cell Carcinoma." Clin Cancer Res 11(20): 7538-7544.

Buser, C. A. and McLaughlin, S. (1998). "Ultracentrifugation Technique for Measuring the Binding of Peptides and Proteins to Sucrose-Loaded Phospholipid Vesicles." Methods Mol Biol 84: 267-281.

Caseli, L., Cavaleiro, R. P., Nader, H. B. and Lopes, C. C. (2012). "Probing the Interaction between Heparan Sulfate Proteoglycan with Biologically Relevant Molecules in Mimetic Models for Cell Membranes: A Langmuir Film Study." Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes 1818(5): 1211-1217.

Cevc, G. (1993). Phospholipids Handbook, Taylor & Francis.

Chan, Y. H. M. and Boxer, S. G. (2007). "Model Membrane Systems and Their Applications." Current Opinion in Chemical Biology 11(6): 581-587.

Chang, H. I. and Yeh, M. K. (2012). "Clinical Development of Liposome-Based Drugs: Formulation, Characterization, and Therapeutic Efficacy." Int J Nanomedicine 7: 49-60.

Chatterjee, D. K., Fong, L. S. and Zhang, Y. (2008). "Nanoparticles in Photodynamic Therapy: An Emerging Paradigm." Adv Drug Deliv Rev 60(15): 1627-1637.

Chen, M., Liu, X. and Fahr, A. (2011). "Skin Penetration and Deposition of Carboxyfluorescein and Temoporfin from Different Lipid Vesicular Systems: In Vitro Study with Finite and Infinite Dosage Application." Int J Pharm 408(1-2): 223-234.

Chen, Y., Wu, Q., Zhang, Z., Yuan, L., Liu, X. and Zhou, L. (2012). "Preparation of Curcumin-Loaded Liposomes and Evaluation of Their Skin Permeation and Pharmacodynamics." Molecules 17(5): 5972-5987.

Cheung, B. C. L., Sun, T. H. T., Leenhouts, J. M. and Cullis, P. R. (1998). "Loading of Doxorubicin into Liposomes by Forming Mn²⁺-Drug Complexes." Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes 1414(1-2): 205-216.

Cho, K., Wang, X., Nie, S., Chen, Z. G. and Shin, D. M. (2008). "Therapeutic Nanoparticles for Drug Delivery in Cancer." Clin Cancer Res 14(5): 1310-1316.

Chobanian, J. V., Tall, A. R. and Brecher, P. I. (1979). "Interaction between Unilamellar Egg Yolk Lecithin Vesicles and Human High Density Lipoprotein." Biochemistry 18(1): 180-187.

Choice, E., Ayyobi, A. F., Pritchard, P. H. and Madden, T. D. (1999). "Separation of Liposomes from Plasma Components Using Fast Protein Liquid Chromatography." Anal Biochem 270(1): 1-8.

Chonn, A., Semple, S. C. and Cullis, P. R. (1991). "Separation of Large Unilamellar Liposomes from Blood Components by a Spin Column Procedure - Towards Identifying Plasma-Proteins Which Mediate Liposome Clearance In Vivo." Biochimica Et Biophysica Acta 1070(1): 215-222.

Chowdhary, R. K., Shariff, I. and Dolphin, D. (2003). "Drug Release Characteristics of Lipid Based Benzoporphyrin Derivative." J Pharm Pharm Sci 6(1): 13-19.

Compagnin, C., Moret, F., Celotti, L., Miotto, G., Woodhams, J. H., MacRobert, A. J., Scheglmann, D., Itratni, S. and Reddi, E. (2011). "Meta-Tetra(Hydroxyphenyl)Chlorin-Loaded Liposomes Sterically Stabilised with Poly(Ethylene Glycol) of Different Length and Density: Characterisation, in Vitro Cellular Uptake and Phototoxicity." Photochem Photobiol Sci 10(11): 1751-1759.

Cooper, R. A. (1978). "Influence of Increased Membrane Cholesterol on Membrane Fluidity and Cell Function in Human Red Blood Cells." Journal of Supramolecular Structure 8(4): 413-430.

Cox, R. A. and Garcia-Palmieri, M. R. (1990). Cholesterol, Triglycerides, and Associated Lipoproteins. Clinical Methods: The History, Physical, and Laboratory Examinations. H. K. Walker, W. D. Hall and J. W. Hurst. Boston.

Dahan, A., Miller, J. M. and Amidon, G. L. (2009). "Prediction of Solubility and Permeability Class Membership: Provisional Bcs Classification of the World's Top Oral Drugs." AAPS J 11(4): 740-746.

Damen, J., Dijkstra, J., Regts, J. and Scherphof, G. (1980). "Effect of Lipoprotein-Free Plasma on the Interaction of Human Plasma High Density Lipoprotein with Egg Yolk Phosphatidylcholine Liposomes." Biochim Biophys Acta 620(1): 90-99.

Damen, J., Regts, J. and Scherphof, G. (1981). "Transfer and Exchange of Phospholipid between Small Unilamellar Liposomes and Rat Plasma High Density Lipoproteins. Dependence on Cholesterol Content and Phospholipid Composition." Biochim Biophys Acta 665(3): 538-545.

Damen, J., Regts, J. and Scherphof, G. (1982). "Transfer of [14c]Phosphatidylcholine between Liposomes and Human Plasma High Density Lipoprotein. Partial Purification of a Transfer-Stimulating Plasma Factor Using a Rapid Transfer Assay." Biochim Biophys Acta 712(3): 444-452.

de Visscher, S. A., Kascakova, S., de Bruijn, H. S., van den Heuvel, A., Amelink, A., Sterenborg, H. J., Robinson, D. J., Roodenburg, J. L. and Witjes, M. J. (2011). "Fluorescence Localization and Kinetics of Mthpc and Liposomal Formulations of Mthpc in the Window-Chamber Tumor Model." Lasers Surg Med 43(6): 528-536.

Deamer, D. W. (2010). "From "Banghasomes" to Liposomes: A Memoir of Alec Bangham, 1921-2010." FASEB J 24(5): 1308-1310.

Decker, C. (2013). Liposomen Als Trägersysteme Für Hydrophobe Arzneistoffe - in Vitro Und in Vov Charakterisierung Von Formulierungen Für Den Photosensitizer Temoporfin PhD, Friedrich-Schiller Universität.

Decker, C., Fahr, A., Kuntsche, J. and May, S. (2012). "Selective Partitioning of Cholesterol and a Model Drug into Liposomes of Varying Size." Chemistry and Physics of Lipids 165(5): 520-529.

Decker, C., Schubert, H., May, S. and Fahr, A. (2013a). "Pharmacokinetics of Temoporfin-Loaded Liposome Formulations: Correlation of Liposome and Temoporfin Blood Concentration." Journal of Controlled Release 166(3): 277-285.

Decker, C., Steiniger, F. and Fahr, A. (2013b). "Transfer of a Lipophilic Drug (Temoporfin) between Small Unilamellar Liposomes and Human Plasma Proteins: Influence of Membrane Composition on Vesicle Integrity and Release Characteristics." Journal of Liposome Research 23(2): 154-165.

Derksen, J. T. P., Morselt, H. W. M. and Scherphof, G. L. (1987). "Processing of Different Liposome Markers after Invitro Uptake of Immunoglobulin-Coated Liposomes by Rat-Liver Macrophages." Biochimica Et Biophysica Acta 931(1): 33-40.

Deshpande, P. P., Biswas, S. and Torchilin, V. P. (2013). "Current Trends in the Use of Liposomes for Tumor Targeting." Nanomedicine 8(9): 1509-1528.

Dolmans, D. E., Fukumura, D. and Jain, R. K. (2003). "Photodynamic Therapy for Cancer." Nat Rev Cancer 3(5): 380-387.

Dragicevic-Curic, N., Friedrich, M., Petersen, S., Scheglmann, D., Douroumis, D., Plass, W. and Fahr, A. (2011). "Assessment of Fluidity of Different Invasomes by Electron Spin Resonance and Differential Scanning Calorimetry." Int J Pharm 412(1-2): 85-94.

Drummond, D. C., Noble, C. O., Guo, Z. X., Hong, K., Park, J. W. and Kirpotin, D. B. (2006). "Development of a Highly Active Nanoliposomal Irinotecan Using a Novel Intraliposomal Stabilization Strategy." Cancer Research 66(6): 3271-3277.

Eeman, M. and Deleu, M. (2010). "From Biological Membranes to Biomimetic Model Membranes." Biotechnologie Agronomie Societe Et Environnement 14(4): 719-736.

Ehrenberg, B. and Gross, E. (1988). "The Effect of Liposomes Membrane-Composition on the Binding of the Photosensitizers Hpd and Photofrin-Ii." Photochemistry and Photobiology 48(4): 461-466.

El Tayar, N., Mark, A. E., Vallat, P., Brunne, R. M., Testa, B. and van Gunsteren, W. F. (1993). "Solvent-Dependent Conformation and Hydrogen-Bonding Capacity of Cyclosporin A: Evidence from Partition Coefficients and Molecular Dynamics Simulations." Journal of Medicinal Chemistry 36(24): 3757-3764.

European Medicines Agency. (2013, 07.2013). "Foscan." Retrieved 17.01., 2016, from http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Summary_for_the_public/human/000318/WC500024392.pdf,

Evora, C., Soriano, I., Rogers, R. A., Shakesheff, K. N., Hanes, J. and Langer, R. (1998). "Relating the Phagocytosis of Microparticles by Alveolar Macrophages to Surface Chemistry: The Effect of 1,2-Dipalmitoylphosphatidylcholine." J Control Release 51(2-3): 143-152.

Fahr, A., Holz, M. and Fricker, G. (1995). "Liposomal Formulations of Cyclosporin A: Influence of Lipid Type and Dose on Pharmacokinetics." Pharm Res 12(8): 1189-1198.

Fahr, A. and Liu, X. (2007). "Drug Delivery Strategies for Poorly Water-Soluble Drugs." Expert Opin Drug Deliv 4(4): 403-416.

Fahr, A. and Reiter, G. (1999). "Biophysical Characterisation of Liposomal Delivery Systems for Lipophilic Drugs: Cyclosporin a as an Example." Cellular & Molecular Biology Letters 4(4): 611-623.

Fahr, A. and Seelig, J. (2001). "Liposomal Formulations of Cyclosporin A: A Biophysical Approach to Pharmacokinetics and Pharmacodynamics." Crit Rev Ther Drug Carrier Syst 18(2): 141-172.

Fahr, A., van Hoogevest, P., May, S., Bergstrand, N. and ML, S. L. (2005). "Transfer of Lipophilic Drugs between Liposomal Membranes and Biological Interfaces: Consequences for Drug Delivery." Eur J Pharm Sci 26(3-4): 251-265.

Fan, Y. and Zhang, Q. (2013). "Development of Liposomal Formulations: From Concept to Clinical Investigations." Asian Journal of Pharmaceutical Sciences 8(2): 81-87.

Fritze, A., Hens, F., Kimpfler, A., Schubert, R. and Peschka-Suss, R. (2006). "Remote Loading of Doxorubicin into Liposomes Driven by a Transmembrane Phosphate Gradient." Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes 1758(10): 1633-1640.

Gabizon, A. and Papahadjopoulos, D. (1988). "Liposome Formulations with Prolonged Circulation Time in Blood and Enhanced Uptake by Tumors." Proc Natl Acad Sci U S A 85(18): 6949-6953.

Geraldo, V. P. N., Pavinatto, F. J., Nobre, T. M., Caseli, L. and Oliveira, O. N. (2013). "Langmuir Films Containing Ibuprofen and Phospholipids." Chemical Physics Letters 559: 99-106.

Glanzmann, T., Hadjur, C., Zellweger, M., Grosiean, P., Forrer, M., Ballini, J. P., Monnier, P., van den Bergh, H., Lim, C. K. and Wagnieres, G. (1998). "Pharmacokinetics of Tetra(M-Hydroxyphenyl)Chlorin in Human Plasma and Individualized Light Dosimetry in Photodynamic Therapy." Photochem Photobiol 67(5): 596-602.

Green, S. R., Beltz, W. F., Goldberg, D. I. and Pittman, R. C. (1989). "Cholesteryl Oleyl and Linoleyl Ethers Do Not Trace Their Ester Counterparts in Animals with Plasma Cholesteryl Ester Transfer Activity." J Lipid Res 30(9): 1405-1410.

Gregoriadis, G. (1992). Liposome Technology, Second Edition, Taylor & Francis.

Grubisic, Z., Rempp, P. and Benoit, H. (1967). "A Universal Calibration for Gel Permeation Chromatography." Journal of Polymer Science Part B-Polymer Letters 5(9pb): 753-&.

Grüll, H. and Langereis, S. (2012). "Hyperthermia-Triggered Drug Delivery from Temperature-Sensitive Liposomes Using Mri-Guided High Intensity Focused Ultrasound." J Control Release 161(2): 317-327.

Gubernator, J. (2011). "Active Methods of Drug Loading into Liposomes: Recent Strategies for Stable Drug Entrapment and Increased in Vivo Activity." Expert Opinion on Drug Delivery 8(5): 565-580.

Guo, L. S. S., Hamilton, R. L., Goerke, J., Weinstein, J. N. and Havel, R. J. (1980). "Interaction of Unilamellar Liposomes with Serum-Lipoproteins and Apolipoproteins." Journal of Lipid Research 21(8): 993-1003.

Ha, Y. C. and Barter, P. J. (1982). "Differences in Plasma Cholesteryl Ester Transfer Activity in 16 Vertebrate Species." Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology 71(2): 265-269.

Hafner, A., Lovric, J., Lakos, G. P. and Pepic, I. (2014). "Nanotherapeutics in the Eu: An Overview on Current State and Future Directions." Int J Nanomedicine 9: 1005-1023.

Hamilton, J. A. and Cistola, D. P. (1986). "Transfer of Oleic Acid between Albumin and Phospholipid Vesicles." Proc Natl Acad Sci U S A 83(1): 82-86.

Hamor, M. J., Hamor, T. A. and Hoard, J. L. (1964). "The Structure of Crystalline Tetraphenylporphine. The Stereochemical Nature of the Porphine Skeleton." Journal of the American Chemical Society 86(10): 1938-1942.

Hasan, M., Belhaj, N., Benachour, H., Barberi-Heyob, M., Kahn, C. J., Jabbari, E., Linder, M. and Arab-Tehrany, E. (2014). "Liposome Encapsulation of Curcumin: Physico-Chemical Characterizations and Effects on Mcf7 Cancer Cell Proliferation." Int J Pharm 461(1-2): 519-528.

Hefesha, H., Loew, S., Liu, X. L., May, S. and Fahr, A. (2011). "Transfer Mechanism of Temoporfin between Liposomal Membranes." Journal of Controlled Release 150(3): 279-286.

Hernandez-Borrell, J., Mas, F. and Puy, J. (1990). "A Theoretical Approach to Describe Monolayer-Liposome Lipid Interaction." Biophys Chem 36(1): 47-55.

Hinna, A., Steiniger, F., Hupfeld, S., Brandl, M. and Kuntsche, J. (2014). "Asymmetrical Flow Field-Flow Fractionation with on-Line Detection for Drug Transfer Studies: A Feasibility Study." Analytical and Bioanalytical Chemistry 406(30): 7827-7839.

Holzschuh, S., Kaess, K., Fahr, A. and Decker, C. (2015). "Quantitative in Vitro Assessment of Liposome Stability and Drug Transfer Employing Asymmetrical Flow Field-Flow Fractionation (Af4)." Pharm Res.

Hupfeld, S., Ausbacher, D. and Brandl, M. (2009a). "Asymmetric Flow Field-Flow Fractionation of Liposomes: 2. Concentration Detection and Adsorptive Loss Phenomena." Journal of Separation Science 32(20): 3555-3561.

Hupfeld, S., Ausbacher, D. and Brandl, M. (2009b). "Asymmetric Flow Field-Flow Fractionation of Liposomes: Optimization of Fractionation Variables." Journal of Separation Science 32(9): 1465-1470.

Huynh, L., Perrot, N., Beswick, V., Rosilio, V., Curmi, P. A., Sanson, A. and Jamin, N. (2014). "Structural Properties of Popc Monolayers under Lateral Compression: Computer Simulations Analysis." Langmuir 30(2): 564-573.

Immordino, M. L., Dosio, F. and Cattell, L. (2006a). "Stealth Liposomes: Review of the Basic Science, Rationale, and Clinical Applications, Existing and Potential." International Journal of Nanomedicine 1(3): 297-315.

Immordino, M. L., Dosio, F. and Cattell, L. (2006b). "Stealth Liposomes: Review of the Basic Science, Rationale, and Clinical Applications, Existing and Potential." Int J Nanomedicine 1(3): 297-315.

Ishida, T., Harada, M., Wang, X. Y., Ichihara, M., Irimura, K. and Kiwada, H. (2005). "Accelerated Blood Clearance of Pegylated Liposomes Following Preceding Liposome Injection: Effects of Lipid Dose and Peg Surface-Density and Chain Length of the First-Dose Liposomes." J Control Release 105(3): 305-317.

Ishida, T., Maeda, R., Ichihara, M., Irimura, K. and Kiwada, H. (2003). "Accelerated Clearance of Pegylated Liposomes in Rats after Repeated Injections." J Control Release 88(1): 35-42.

Kachatkou, D., Sasnouski, S., Zorin, V., Zorina, T., D'Hallewin, M. A., Guillemin, F. and Bezdetnaya, L. (2009). "Unusual Photoinduced Response of Mthpc Liposomal Formulation (Foslip)." Photochem Photobiol 85(3): 719-724.

Kaess, K. and Fahr, A. (2014). "Liposomes as Solubilizers for Lipophilic Parenteral Drugs: Transfer of Drug and Lipid Marker to Plasma Proteins." European Journal of Lipid Science and Technology 116(9): 1137-1144.

Kaganer, V. M., Möhwald, H. and Dutta, P. (1999). "Structure and Phase Transitions in Langmuir Monolayers." Reviews of Modern Physics 71(3): 779-819.

Kastner, E., Verma, V., Lowry, D. and Perrie, Y. (2015). "Microfluidic-Controlled Manufacture of Liposomes for the Solubilisation of a Poorly Water Soluble Drug." Int J Pharm 485(1-2): 122-130.

Kepczynski, M., Nawalany, K., Kumorek, M., Kobierska, A., Jachimska, B. and Nowakowska, M. (2008). "Which Physical and Structural Factors of Liposome Carriers Control Their Drug-Loading Efficiency?" Chem Phys Lipids 155(1): 7-15.

Kimelberg, H. K., Tracy, T. F., Jr., Biddlecome, S. M. and Bourke, R. S. (1976). "The Effect of Entrapment in Liposomes on the in Vivo Distribution of [3h]Methotrexate in a Primate." Cancer Res 36(8): 2949-2957.

Kirby, C., Clarke, J. and Gregoriadis, G. (1980). "Cholesterol Content of Small Unilamellar Liposomes Controls Phospholipid Loss to High-Density Lipoproteins in the Presence of Serum." Febs Letters 111(2): 324-328.

Kjaer, K., Als-Nielsen, J., Helm, C. A., Tippman-Krayer, P. and Moehwald, H. (1989). "Synchrotron X-Ray Diffraction and Reflection Studies of Arachidic Acid Monolayers at the Air-Water Interface." The Journal of Physical Chemistry 93(8): 3200-3206.

Knop, K., Hoogenboom, R., Fischer, D. and Schubert, U. S. (2010). "Poly(Ethylene Glycol) in Drug Delivery: Pros and Cons as Well as Potential Alternatives." Angew Chem Int Ed Engl 49(36): 6288-6308.

Krauser, J. A. (2013). "A Perspective on Tritium Versus Carbon-14: Ensuring Optimal Label Selection in Pharmaceutical Research and Development." J Labelled Comp Radiopharm 56(9-10): 441-446.

Kreuter, J. (1994). Colloidal Drug Delivery Systems, Taylor & Francis.

Kuntsche, J., Decker, C. and Fahr, A. (2012). "Analysis of Liposomes Using Asymmetrical Flow Field-Flow Fractionation: Separation Conditions and Drug/Lipid Recovery." Journal of Separation Science 35(15): 1993-2001.

Kuntsche, J., Freisleben, I., Steiniger, F. and Fahr, A. (2010). "Temoporfin-Loaded Liposomes: Physicochemical Characterization." European Journal of Pharmaceutical Sciences 40(4): 305-315.

Lange, Y., Molinaro, A. L., Chauncey, T. R. and Steck, T. L. (1983). "On the Mechanism of Transfer of Cholesterol between Human-Erythrocytes and Plasma." Journal of Biological Chemistry 258(11): 6920-6926.

Lavi, A., Weitman, H., Holmes, R. T., Smith, K. M. and Ehrenberg, B. (2002). "The Depth of Porphyrin in a Membrane and the Membrane's Physical Properties Affect the Photosensitizing Efficiency." Biophysical Journal 82(4): 2101-2110.

Lee, J. Y., Choi, D., Johan, C. and Moon, M. H. (2011). "Improvement of Lipoprotein Separation with a Guard Channel Prior to Asymmetrical Flow Field-Flow Fractionation Using Fluorescence Detection." J Chromatogr A 1218(27): 4144-4148.

Lelkes, P. I. and Tandeter, H. B. (1982). "Studies on the Methodology of the Carboxyfluorescein Assay and on the Mechanism of Liposome Stabilization by Red Blood Cells in Vitro." Biochim Biophys Acta 716(3): 410-419.

Leonard-Latour, M., Morelis, R. M. and Coulet, P. R. (1997). "Interaction of Dmpc Liposomes with a Dmpa Monolayer: Related Study of Langmuir-Blodgett Films." Supramolecular Science 4(3-4): 357-363.

Leonenko, Z. V., Finot, E., Ma, H., Dahms, T. E. and Cramb, D. T. (2004). "Investigation of Temperature-Induced Phase Transitions in Dopc and Dppc Phospholipid Bilayers Using Temperature-Controlled Scanning Force Microscopy." Biophys J 86(6): 3783-3793.

Letizia, J. Y. and Phillips, M. C. (1991). "Effects of Apolipoproteins on the Kinetics of Cholesterol Exchange." Biochemistry 30(3): 866-873.

Liu, X. L., Hefesha, H., Scriba, G. and Fahr, A. (2008). "Retention Behavior of Neutral and Positively and Negatively Charged Solutes on an Immobilized-Artificial-Membrane (Iam) Stationary Phase." Helvetica Chimica Acta 91(8): 1505-1512.

Loftsson, T. and Brewster, M. E. (2010). "Pharmaceutical Applications of Cyclodextrins: Basic Science and Product Development." J Pharm Pharmacol 62(11): 1607-1621.

Ma, G. and Allen, H. C. (2006). "Dppc Langmuir Monolayer at the Air-Water Interface: Probing the Tail and Head Groups by Vibrational Sum Frequency Generation Spectroscopy." Langmuir 22(12): 5341-5349.

Madden, T. D., Harrigan, P. R., Tai, L. C., Bally, M. B., Mayer, L. D., Redelmeier, T. E., Loughrey, H. C., Tilcock, C. P., Reinish, L. W. and Cullis, P. R. (1990). "The Accumulation of Drugs within Large Unilamellar Vesicles Exhibiting a Proton Gradient: A Survey." Chem Phys Lipids 53(1): 37-46.

Madorin, M., van Hoogevest, P., Hilfiker, R., Langwost, B., Kresbach, G. M., Ehrat, M. and Leuenberger, H. (1997). "Analysis of Drug Plasma Protein Interactions by Means of Asymmetrical Flow Field Flow Fractionation." Pharmaceutical Research 14(12): 1706-1712.

Magarkar, A., Dhawan, V., Kallinteri, P., Viitala, T., Elmowafy, M., Rog, T. and Bunker, A. (2014). "Cholesterol Level Affects Surface Charge of Lipid Membranes in Saline Solution." Sci Rep 4: 5005.

Malvern Instruments Ltd. (2016). "Nanoparticle Tracking Analysis - Zählung, Größenbestimmung Und Visualisierung." Retrieved 2016, 15.02, from <http://www.malvern.com/de/products/technology/nanoparticle-tracking-analysis/>,

Marrink, S. J., Berger, O., Tieleman, P. and Jahnig, F. (1998). "Adhesion Forces of Lipids in a Phospholipid Membrane Studied by Molecular Dynamics Simulations." Biophysical Journal 74(2): 931-943.

März, W., Beckmann, A., Scharnagl, H., Siekmeier, R., Mondorf, U., Held, I., Schneider, W., Preissner, K. T., Curtiss, L. K., Gross, W. and et al. (1993). "Heterogeneous Lipoprotein (a) Size Isoforms Differ by Their Interaction with the Low Density Lipoprotein Receptor and the Low Density Lipoprotein Receptor-Related Protein/Alpha 2-Macroglobulin Receptor." FEBS Lett 325(3): 271-275.

Matsumura, Y. and Maeda, H. (1986). "A New Concept for Macromolecular Therapeutics in Cancer Chemotherapy: Mechanism of Tumorotropic Accumulation of Proteins and the Antitumor Agent Smancs." Cancer Res 46(12 Pt 1): 6387-6392.

McLean, L. R. and Phillips, M. C. (1981). "Mechanism of Cholesterol and Phosphatidylcholine Exchange or Transfer between Unilamellar Vesicles." Biochemistry 20(10): 2893-2900.

Michael-Titus, A. T., Whelpton, R. and Yaqub, Z. (1995). "Binding of Temoporfin to the Lipoprotein Fractions of Human Serum." British Journal of Clinical Pharmacology 40(6): 594-597.

Modlinska, A. and Bauman, D. (2011). "The Langmuir-Blodgett Technique as a Tool for Homeotropic Alignment of Fluorinated Liquid Crystals Mixed with Arachidic Acid." Int J Mol Sci 12(8): 4923-4945.

Moghaddam, B., Ali, M. H., Wilkhu, J., Kirby, D. J., Mohammed, A. R., Zheng, Q. and Perrie, Y. (2011). "The Application of Monolayer Studies in the Understanding of Liposomal Formulations." Int J Pharm 417(1-2): 235-244.

Moghimi, S. M. and Patel, H. M. (1989). "Differential Properties of Organ-Specific Serum Opsonins for Liver and Spleen Macrophages." Biochim Biophys Acta 984(3): 379-383.

Molnar, D. (2015). Insertionsstabilität Cholesterol Basierter Peg-Anker in Liposomen Thesis, Universität Freiburg.

Moore, J. C. (1964). "Gel Permeation Chromatography .I. New Method for Molecular Weight Distribution of High Polymers." Journal of Polymer Science Part a-General Papers 2(2pa): 835-&.

Moussa, H. G., Martins, A. M. and Hussein, G. A. (2015). "Review on Triggered Liposomal Drug Delivery with a Focus on Ultrasound." Curr Cancer Drug Targets 15(4): 282-313.

Muralidharan, P., Mallory, E., Malapit, M., Hayes, D., Jr. and Mansour, H. M. (2014). "Inhalable Pegylated Phospholipid Nanocarriers and Pegylated Therapeutics for Respiratory Delivery as Aerosolized Colloidal Dispersions and Dry Powder Inhalers." Pharmaceutics 6(2): 333-353.

Murata, N., Sato, K., Kon, J., Tomura, H., Yanagita, M., Kuwabara, A., Ui, M. and Okajima, F. (2000). "Interaction of Sphingosine 1-Phosphate with Plasma Components, Including Lipoproteins, Regulates the Lipid Receptor-Mediated Actions." Biochem J 352 Pt 3: 809-815.

NCBI. (2004-2016). "Pubchem." Retrieved 2015, 13.12., from <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>, Curcumin, Estradiol, Propofol, Temoporfin

New, R. R. C. (1990). Liposomes: A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press.

Ochoa, P. S. and Vega, J. A. (2014). Concepts in Sterile Preparations and Aseptic Technique, Jones & Bartlett Learning, LLC: 1-16.

Oliveira, C. R., Lima, M. C. P., Carvalho, C. A. M., Leysen, J. E. and Carvalho, A. P. (1989). "Partition-Coefficients of Dopamine Antagonists in Brain Membranes and Liposomes." Biochemical Pharmacology 38(13): 2113-2120.

Papahadjopoulos, D., Jacobson, K., Nir, S. and Isac, T. (1973). "Phase Transitions in Phospholipid Vesicles. Fluorescence Polarization and Permeability Measurements Concerning the Effect of Temperature and Cholesterol." Biochim Biophys Acta 311(3): 330-348.

Petersen, S., Fahr, A. and Bunjes, H. (2010). "Flow Cytometry as a New Approach to Investigate Drug Transfer between Lipid Particles." Mol Pharm 7(2): 350-363.

Pfizer Canada Inc. (2012). "Viracept (Product Monograph)." Retrieved 2015, 13.12., from http://www.pfizer.ca/sites/g/files/g10017036/f/201410/VIRACEPT_PM_E_155130_21Dec2012.pdf,

PharmaCircle LLC. (2016). "Pharmacircle." Retrieved 05.01.2016, 2016, from www.pharmacircle.com, Suchbegriffe in DD category: NP liposome, NP liposome cationic

Pinto, A. J., Stewart, D., van Rooijen, N. and Morahan, P. S. (1991). "Selective Depletion of Liver and Splenic Macrophages Using Liposomes Encapsulating the Drug Dichloromethylene Diphosphonate: Effects on Antimicrobial Resistance." J Leukoc Biol 49(6): 579-586.

Postigo, F., Mora, M., De Madariaga, M. A., Nonell, S. and Sagrista, M. L. (2004). "Incorporation of Hydrophobic Porphyrins into Liposomes: Characterization and Structural Requirements." Int J Pharm 278(2): 239-254.

Qureshi, R. N., Kok, W. T. and Schoenmakers, P. J. (2009). "Fractionation of Human Serum Lipoproteins and Simultaneous Enzymatic Determination of Cholesterol and Triglycerides." Analytica Chimica Acta 654(1): 85-91.

Rao, V. M., Haslam, J. L. and Stella, V. J. (2001). "Controlled and Complete Release of a Model Poorly Water-Soluble Drug, Prednisolone, from Hydroxypropyl Methylcellulose Matrix Tablets Using (Sbe)(7m)-Beta-Cyclodextrin as a Solubilizing Agent." J Pharm Sci 90(7): 807-816.

Reshetov, V., Kachatkou, D., Shmigol, T., Zorin, V., D'Hallewin, M. A., Guillemin, F. and Bezdetnaya, L. (2011). "Redistribution of Meta-Tetra(Hydroxyphenyl)Chlorin (M-Thpc) from Conventional and Pegylated Liposomes to Biological Substrates." Photochem Photobiol Sci 10(6): 911-919.

Reshetov, V., Lassalle, H. P., Francois, A., Dumas, D., Hupont, S., Grafe, S., Filipe, V., Jiskoot, W., Guillemin, F., Zorin, V. and Bezdetnaya, L. (2013). "Photodynamic Therapy with Conventional and Pegylated Liposomal Formulations of Mthpc (Temoporfin): Comparison of Treatment Efficacy and Distribution Characteristics in Vivo." Int J Nanomedicine 8: 3817-3831.

Reshetov, V., Zorin, V., Siupa, A., D'Hallewin, M. A., Guillemin, F. and Bezdetnaya, L. (2012). "Interaction of Liposomal Formulations of Meta-Tetra(Hydroxyphenyl)Chlorin (Temoporfin) with Serum Proteins: Protein Binding and Liposome Destruction." Photochem Photobiol 88(5): 1256-1264.

Ricchelli, F. (1995). "Photophysical Properties of Porphyrins in Biological-Membranes." Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology 29(2-3): 109-118.

Ricchelli, F., Gobbo, S., Moreno, G., Salet, C., Brancaleon, L. and Mazzini, A. (1998). "Photophysical Properties of Porphyrin Planar Aggregates in Liposomes." European Journal of Biochemistry 253(3): 760-765.

Rüger, R. (2008). Liposomen Zur Zielsteuerung Von Arzneistoffen - Oberflächenmodifikationen PhD, Friedrich-Schiller University.

Ruysschaert, T., Marque, A., Duteyrat, J. L., Lesieur, S., Winterhalter, M. and Fournier, D. (2005). "Liposome Retention in Size Exclusion Chromatography." BMC Biotechnol 5: 11.

Sasnouski, S., Zorin, V., Khludeyev, I., D'Hallewin, M. A., Guillemin, F. and Bezdetnaya, L. (2005). "Investigation of Foscan Interactions with Plasma Proteins." Biochim Biophys Acta 1725(3): 394-402.

Savjani, K. T., Gajjar, A. K. and Savjani, J. K. (2012). "Drug Solubility: Importance and Enhancement Techniques." ISRN Pharm 2012: 195727.

Scherphof, G. and Morselt, H. (1984). "On the Size-Dependent Disintegration of Small Unilamellar Phosphatidylcholine Vesicles in Rat Plasma - Evidence of Complete Loss of Vesicle Structure." Biochemical Journal 221(2): 423-429.

Scherphof, G., Roerdink, F., Waite, M. and Parks, J. (1978). "Disintegration of Phosphatidylcholine Liposomes in Plasma as a Result of Interaction with High-Density Lipoproteins." Biochim Biophys Acta 542(2): 296-307.

Scherphof, G., Vanleeuwen, B., Wilschut, J. and Damen, J. (1983). "Exchange of Phosphatidylcholine between Small Unilamellar Liposomes and Human-Plasma High-Density Lipoprotein Involves Exclusively the Phospholipid in the Outer Monolayer of the Liposomal Membrane." Biochimica Et Biophysica Acta 732(3): 595-599.

Scherphof, G. L., Dijkstra, J., Spanjer, H. H., Derksen, J. T. and Roerdink, F. H. (1985). "Uptake and Intracellular Processing of Targeted and Nontargeted Liposomes by Rat Kupffer Cells in Vivo and in Vitro." Ann N Y Acad Sci 446: 368-384.

Seelig, A. (1987). "Local Anesthetics and Pressure: A Comparison of Dibucaine Binding to Lipid Monolayers and Bilayers." Biochim Biophys Acta 899(2): 196-204.

Senge, M. O. and Brandt, J. C. (2011). "Temoporfin (Foscan (R), 5,10,15,20-Tetra(M-Hydroxyphenyl)Chlorin)-a Second-Generation Photosensitizer." Photochemistry and Photobiology 87(6): 1240-1296.

Senior, J. H., Trimble, K. R. and Maskiewicz, R. (1991). "Interaction of Positively-Charged Liposomes with Blood: Implications for Their Application in Vivo." Biochim Biophys Acta 1070(1): 173-179.

Sharma, A. and Sharma, U. S. (1997). "Liposomes in Drug Delivery: Progress and Limitations." International Journal of Pharmaceutics 154(2): 123-140.

Sharma, A., Straubinger, N. L. and Straubinger, R. M. (1993). "Modulation of Human Ovarian Tumor Cell Sensitivity to N-(Phosphonacetyl)-L-Aspartate (Pala) by Liposome Drug Carriers." Pharm Res 10(10): 1434-1441.

Sharma, A. and Straubinger, R. M. (1994). "Novel Taxol Formulations: Preparation and Characterization of Taxol-Containing Liposomes." Pharm Res 11(6): 889-896.

Strebhardt, K. and Ullrich, A. (2008). "Paul Ehrlich's Magic Bullet Concept: 100 Years of Progress." Nat Rev Cancer 8(6): 473-480.

Sulkowski, W. W., Pentak, D., Nowak, K. and Sulkowska, A. (2005). "The Influence of Temperature, Cholesterol Content and Ph on Liposome Stability." Journal of Molecular Structure 744: 737-747.

Szebeni, J., Bedocs, P., Rozsnyay, Z., Weiszhar, Z., Urbanics, R., Rosivall, L., Cohen, R., Garbuzenko, O., Bathori, G., Toth, M., Bunger, R. and Barenholz, Y. (2012). "Liposome-Induced Complement Activation and Related Cardiopulmonary Distress in Pigs: Factors Promoting Reactogenicity of Doxil and Ambisome." Nanomedicine 8(2): 176-184.

Tall, A. R., Abreu, E. and Shuman, J. (1983). "Separation of a Plasma Phospholipid Transfer Protein from Cholesterol Ester/Phospholipid Exchange Protein." J Biol Chem 258(4): 2174-2180.

Tanford, C. (1978). "The Hydrophobic Effect and the Organization of Living Matter." Science 200(4345): 1012-1018.

Taylor, K. M. and Newton, J. M. (1992). "Liposomes for Controlled Delivery of Drugs to the Lung." Thorax 47(4): 257-259.

Tekrony, A. D., Kelly, N. M., Fage, B. A. and Cramb, D. T. (2011). "Photobleaching Kinetics of Verteporfin and Lemuteporfin in Cells and Optically Trapped Multilamellar Vesicles Using Two-Photon Excitation." Photochem Photobiol 87(4): 853-861.

Torchilin, V. (2011). "Tumor Delivery of Macromolecular Drugs Based on the Epr Effect." Adv Drug Deliv Rev 63(3): 131-135.

Torchilin, V. P. (2005). "Recent Advances with Liposomes as Pharmaceutical Carriers." Nature Reviews Drug Discovery 4(2): 145-160.

van Hoogevest, P., Leigh, M. and Fahr, A. (2013). Liposomes as Intravenous Solubilizers for Poorly Water-Soluble Drugs. Drug Delivery Strategies for Poorly Water-Soluble Drugs, John Wiley & Sons Ltd: 37-66.

van Hoogevest, P., Liu, X., Fahr, A. and Leigh, M. L. S. (2011). "Role of Phospholipids in the Oral and Parenteral Delivery of Poorly Water Soluble Drugs." Journal of Drug Delivery Science and Technology 21(1): 5-16.

Vargaftik, N. B., Volkov, B. N. and Voljak, L. D. (1983). "International Tables of the Surface Tension of Water." Journal of Physical and Chemical Reference Data 12(3): 817-820.

Veres, D., Bocskei-Antal, B., Voszka, I., Modos, K., Csik, G., Kaposi, A. D., Fidy, J. and Herenyi, L. (2012). "Comparison of Binding Ability and Location of Two Mesoporphyrin Derivatives in Liposomes Explored with Conventional and Site-Selective Fluorescence Spectroscopy." J Phys Chem B 116(32): 9644-9652.

Wagner, M., Holzschuh, S., Traeger, A., Fahr, A. and Schubert, U. S. (2014). "Asymmetric Flow Field-Flow Fractionation in the Field of Nanomedicine." Analytical Chemistry 86(11): 5201-5210.

Wahlund, K. G. and Giddings, J. C. (1987). "Properties of an Asymmetrical Flow Field-Flow Fractionation Channel Having One Permeable Wall." Anal Chem 59(9): 1332-1339.

Weinstein, J. N., Yoshikami, S., Henkart, P., Blumenthal, R. and Hagins, W. A. (1977). "Liposome-Cell Interaction: Transfer and Intracellular Release of a Trapped Fluorescent Marker." Science 195(4277): 489-492.

Willis, L., Hayes, D., Jr. and Mansour, H. M. (2012). "Therapeutic Liposomal Dry Powder Inhalation Aerosols for Targeted Lung Delivery." Lung 190(3): 251-262.

Wirtz, K. W. (1991). "Phospholipid Transfer Proteins." Annu Rev Biochem 60: 73-99.

Worthman, L. A., Nag, K., Davis, P. J. and Keough, K. M. (1997). "Cholesterol in Condensed and Fluid Phosphatidylcholine Monolayers Studied by Epifluorescence Microscopy." Biophys J 72(6): 2569-2580.

Xie, H., Svenmarker, P., Axelsson, J., Grafe, S., Kyriazi, M., Bendsoe, N., Andersson-Engels, S. and Svanberg, K. (2015). "Pharmacokinetic and Biodistribution Study Following Systemic Administration of Fospeg(R)--a Pegylated Liposomal Mthpc Formulation in a Murine Model." J Biophotonics 8(1-2): 142-152.

Yan, X., Scherphof, G. L. and Kamps, J. A. (2005). "Liposome Opsonization." J Liposome Res 15(1-2): 109-139.

Yang, K., Delaney, J. T., Schubert, U. S. and Fahr, A. (2012). "Fast High-Throughput Screening of Temoporfin-Loaded Liposomal Formulations Prepared by Ethanol Injection Method." J Liposome Res 22(1): 31-41.

Yun, H. J. C., Young Wook; Kim, Nam Jeong; Sohn, Dae Won (2003). "Physicochemical Properties of Phosphatidylcholine (Pc) Monolayers with Different Alkyl Chains, at the Air/Water Interface." Bulletin of the Korean Chemical Society 24(3): 7.

Zhang, K. D., Chen, M., Scriba, G. K. E., Abraham, M. H., Fahr, A. and Liu, X. L. (2011). "Linear Free Energy Relationship Analysis of Retention Factors in Cerasome Electrokinetic Chromatography Intended for Predicting Drug Skin Permeation." Journal of Pharmaceutical Sciences 100(8): 3105-3113.

Selbständigkeitserklärung

Ich, Stephan Holzschuh, geboren am 24.12.1986 in Erfurt, erkläre hiermit, dass mir die Promotionsordnung der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist und dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen.

Folgende Personen haben mich bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Erstellung des Manuskripts – im Speziellen der sprachlichen Korrektur – unterstützt:

Prof. Dr. Alfred Fahr, Prof. Dr. Judith Kuntsche, Dr. Ronny Rüger, Dr. Christiane Decker, Markus Rabenhold, Yvette Pötzinger.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Haan, 18.04.2016

Stephan Holzschuh